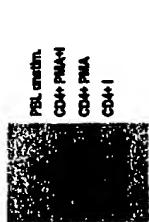


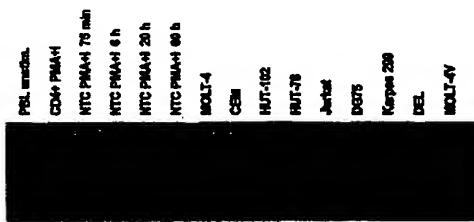
(51) Internationale Patentklassifikation 6 :  C07K 14/00	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/15553  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. April 1999 (01.04.99)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/02896  (22) Internationales Anmeldedatum: 23. September 1998 (23.09.98)	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
(30) Prioritätsdaten: 197 41 929.1 23. September 1997 (23.09.97) DE 198 21 060.4 11. Mai 1998 (11.05.98) DE	Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(71) Anmelder ( <i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i> ): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS [DE/DE]; Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).	
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder ( <i>nur für US</i> ): KROCZEK, Richard [DE/DE]; Molekulare Immunologie, Robert-Koch-Institut, Nordufer 20, D-13353 Berlin (DE).	
(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).	

(54) Title: COSTIMULATING T-CELL POLYPEPTIDE, MONOCLONAL ANTIBODIES, THEIR PREPARATION AND USE
(54) Bezeichnung: KO-STIMULIERENDES POLYPEPTID VON T-ZELLEN, MONOKLONALE ANTIKÖRPER SOWIE DIE HERSTELLUNG UND DEREN VERWENDUNG



A



B

## (57) Abstract

A polypeptide (8F4 molecule) with a T-cell costimulating biological activity is disclosed, as well as monoclonal antibodies against said 8F4 molecule and hybridoma cells which produce the monoclonal antibodies, the use as medicaments of substances which inhibit the biological activity of the disclosed 8F4 polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, the use of said 8F4 molecule or cells containing said 8F4 molecule as medicaments, in particular for preventing or treating diseases which involve the immune system, and the use of substances which specifically recognise the disclosed polypeptide, in particular monoclonal antibodies, natural or synthetic ligands, agonists or antagonists, for diagnosing diseases which involve the immune system.

**(57) Zusammenfassung**

Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfundungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfundungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Maurenien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

## **Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung**

5 Die Erfindung betrifft ein Polypeptid (8F4-Molekül) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Weiterhin betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül und Hybridomzellen, die die monoklonalen Antikörper herstellen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, insbesondere monoklonale Antikörper, 10 natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, als Arzneimittel. Insbesondere betrifft die Erfindung die Verwendung dieser Substanzen zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten und zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung des 8F4-Moleküls oder 15 von Zellen, die das 8F4-Molekül enthalten, als Arzneimittel, insbesondere zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen. Weiterhin betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, 20 insbesondere monoklonale Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist. Insbesondere betrifft die Erfindung die Diagnose mittels eines ELISA-Nachweises, einer Durchflußzytometrie, eines Western Blot, eines Radioimmunnachweises, einer Nephelometrie oder einer histochemischen Anfärbung.

25 T-Lymphozyten erkennen ihr Antigen, das von "Antigen-präsentierenden Zellen", z.B. dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen, dargeboten wird, durch ihren T-Zell-Rezeptor. Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor alleine aber reicht in den meisten Fällen nicht aus, um T-Lymphozyten ausreichend zu aktivieren. Hierzu bedarf es der 30 zusätzlichen, gleichzeitigen Stimulation (nachfolgend auch "Ko-Stimulation" genannt) durch andere Rezeptormoleküle auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Eines dieser Rezeptormoleküle ist der sogenannte CD28-Rezeptor, der durch das ko-stimulierende Molekül B7 stimuliert wird. Werden diese "ko-stimulatorischen" Moleküle, z.B. CD28, wirksam, so erreicht die Aktivierung der T-Zellen nach der Erkennung des Antigens durch

den T-Zell-Rezeptor ein ausreichendes Niveau. Nach einer solchen vollständigen Aktivierung exprimiert die T-Zelle zusätzliche Moleküle, z.B. CD25, CD69, CD71, auf der Oberfläche und synthetisiert zahlreiche Zytokine, z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$ , welche die Funktion von Botenstoffen haben. Sowohl diese zusätzlichen Oberflächenmoleküle wie auch die Zytokine dienen dem Informationsaustausch der T-Zelle mit anderen Zellen des Immunsystems. Durch die zusätzlichen Oberflächenmoleküle und die Zytokine lenken die aktivierte T-Zellen die gesamte Antigen-spezifische Immunabwehr. Auf diese Weise wird sowohl die Generierung von zytotoxischen Zellen ("Killerzellen") wie auch die Generierung von Antigen-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen gesteuert. Zytotoxische Zellen wie auch die spezifisch gebildeten Antikörper eliminieren virale oder bakterielle Erreger, welche in den Körper eindringen. In einigen Fällen kommt es jedoch zu einem Überschreiten der Immunreaktion und das Immunsystem richtet sich gegen die eigenen Körperzellen. Das führt zum Auftreten von "Autoimmunerkrankungen", z.B. zu rheumatoider Arthritis, Morbus Bechterew, Sjögren-Syndrom, Colitis ulcerosa, u.a. Einer der wesentlichen Orte der Kooperation zwischen Antigen-aktivierten T-Zellen und anderen Zellen des Immunsystems sind die sekundären lymphatischen Organe, darunter die Tonsillen. Hier werden die T-Lymphozyten durch das von dendritischen Zellen präsentierte Antigen aktiviert, hier interagieren T-Lymphozyten mit B-Zellen. Aufgrund dieser Interaktion sezernieren B-Zellen nach mehreren Zwischenstufen der Differenzierung Antigen-spezifische Antikörper vom IgM- und IgG-Typ.

20

Das am besten charakterisierte und bisher mit wirksamste ko-stimulatorische Molekül ist das CD28-Oberflächenmolekül (nachstehend CD28-Rezeptor oder CD28 genannt), das auf einem großen Teil der T-Zellen konstitutiv exprimiert wird. *In vitro* führt die Ko-Stimulation durch CD28 nach Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor zu einer sehr starken Erhöhung der Zytokin-Sekretion von z.B. IL-2 und IFN- $\gamma$  wie auch zu einer deutlichen Heraufregulation der Expression von Zelloberflächen-Molekülen wie CD25, CD69, CD71, welche für die Interaktion der T-Zellen mit anderen Immunzellen, z.B. B-Lymphozyten, notwendig sind; vgl. Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404. Durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor lässt sich des weiteren die Proliferation der T-Lymphozyten deutlich steigern. Auch wird durch die Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor die T-Zell-Steuerung der B-Lymphozyten-Funktion so optimiert, daß es zu einer erhöhten Sekretion von Antikörpern kommt.

Wenn die Funktion des CD28-Rezeptors aufgehoben wird, kommt es zu einer drastischen Funktionseinbuße der Immunabwehr. Das konnte anhand einer transgenen Maus gezeigt

werden, in der das CD28-Gen durch homologe Rekombination zerstört wurde (ein sogenannter "CD28-knock-out"). Die auf diese Weise gestörte Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen führt zu einer fehlenden Ko-Stimulation. Diese wiederum führt zu einer Störung der T-Zell-Funktion, d.h. zu einer verminderten Proliferation der T-Zellen und zu einer drastisch verminderten Synthese verschiedener Zytokine. Die fehlende Ko-Stimulation führt letztendlich zu einer verminderten Funktion der Antigen-spezifischen Immunabwehr. So wird u.a. durch das Fehlen von CD28 die Bildung Antigen-spezifischer IgG1- und IgG2-Antikörper durch B-Lymphozyten auf 10% des Normwertes reduziert; vgl. Shahinian et al., *Science* 262 (1993), 609-612; Lucas et al. *Journal of Immunology* 154 (1995), 5757-10 5768. Über eine Ko-Stimulation durch CD28 kann man *in vitro* auch das Eindringen des Aids-Virus in T-Lymphozyten verhindern; vgl. Riley et al., *Journal of Immunology* 158 (1997), 5545-5553. Entsprechende Versuche sind *in vivo* noch nicht durchgeführt worden. Bekanntlich schaltet CD28 viele Zytokin-Gene an, die *in vivo* zu erheblichen Nebenwirkungen führen können. Die Blockade der Rezeptoren von CD28 durch ein lösliches 15 15 CTLA-4-Immunglobulin-Molekül ist im Affenmodell erfolgreich eingesetzt worden, um die Abstoßung von transplantierten Nieren zu verhindern. Hierbei wurde CTLA-4 in Kombination mit einem Antikörper gegen das CD40-Liganden-Molekül eingesetzt worden; vgl. Kirk et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8789-8794. Die Blockade der CD28-Rezeptoren betrifft jedoch sämtliche T-Lymphozyten und nicht nur die bereits aktivierte, da 20 20 CD28 auf T-Lymphozyten konstitutiv exprimiert wird.

Es besteht somit ein Bedarf an einem ko-stimulierenden Oberflächenmolekül, das nur auf aktivierte T-Lymphozyten exprimiert wird. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Oberflächenmolekül auf aktivierte T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung 25 auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist, bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Substanzen, z.B. monoklonale Antikörper gegen das ko-stimulatorische Oberflächenmolekül, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten des Oberflächenmoleküls bereitzustellen.

30 In einer ersten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, charakterisiert dadurch, daß a) das Polypeptid auf aktivierte CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierte B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen (natürliche Killerzellen) oder dendritischen Zellen vorkommt, und b) das Polypeptid ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein

Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa (Kilodalton) hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelektrophorese (SDS-PAGE), und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-PAGE.

5

Das erfindungsgemäße Polypeptid (nachstehend auch 8F4-Molekül oder 8F4 genannt) wird erst nach Aktivierung der T-Lymphozyten exprimiert, und zwar sowohl auf CD4<sup>+</sup>- wie auch auf CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. In einer nicht reduzierenden SDS-PAGE weist das 8F4-Molekül ein Molekulargewicht zwischen etwa 55 und 60 kDa (Kilodalton) auf. Das 8F4-Molekül ist aus zwei Peptidketten zusammengesetzt, wobei die beiden Peptidketten in einer reduzierenden SDS-PAGE ein Molekulargewicht von etwa 27 und etwa 29 kDa aufweisen. Histologisch kann man das 8F4-Antigen auf aktivierten T-Lymphozyten im lymphatischen Gewebe der Tonsillen und Lymphknoten eindeutig nachweisen, insbesondere in Keimzentren, dem Ort der Interaktion von T-Lymphozyten und B-Lymphozyten bei der Generierung von Antikörpern.

10 15 *Ex vivo* isolierte tonsilliäre T-Zellen sind zu etwa 50-80% positiv für das 8F4-Antigen und weisen Zeichen einer fortgeschrittenen Aktivierung auf. Das 8F4-Molekül ist auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen und dendritischen Zellen nicht nachweisbar.

20 25 Eine wichtige biologische Aktivität des 8F4-Moleküls ist seine ko-stimulierende Aktivität von T-Lymphozyten. Die ko-stimulierende Aktivität kann bestimmt werden nach Linsley, et al., *Journal of Experimental Medicine* 176 (1992), 1595-604. Die ko-stimulierende Aktivität des 8F4-Moleküls ähnelt der ko-stimulierenden Aktivität des CD28-Moleküls, welches als zentrales Verstärkungselement der Antigen-Erkennung durch das Immunsystem identifiziert worden ist. Das 8F4-Molekül unterscheidet sich jedoch in vielen Aspekten von CD28. So muß die Expression des 8F4-Moleküls auf der Oberfläche der T-Zellen erst induziert werden, während CD28 konstitutiv exprimiert wird. Auch in der Funktion sind deutliche Unterschiede nachweisbar: Die Ko-Stimulation über CD28 führt zur Überexpression zahlreicher Lymphokine, u.a. des Interleukin-2 (IL-2). Auch die Ko-Stimulation über 8F4 führt zu einer verstärkten Sekretion von Lymphokinen, nicht jedoch des IL-2. Somit unterscheidet sich die ko-stimulatorische Aktivität des 8F4-Moleküls von der Aktivität des CD28-Moleküls. Da die Stimulation über 8F4 nicht alle Zytokin-Gene anschaltet, ist eine Ko-Stimulation über 8F4 *in vivo* vorteilhaft, z.B. gegenüber einer Ko-Stimulation über den CD28-Rezeptor. Auch unterscheidet sich die Induktion, die Expression, der Expressionsort und die Funktion des

8F4-Moleküs von allen anderen bekannten ko-stimulatorisch wirksamen Molekülen.

Bei dem erfindungsgemäßen 8F4-Molekül handelt es sich um ein neues Oberflächenmolekül auf aktivierten T-Zellen, das eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf zentrale Funktionen der T-Lymphozyten aufweist. Die Expression *in vivo* deutet u.a. auf eine wesentliche Beteiligung des 8F4-Moleküs an der Kooperation von T-Zellen mit anderen Zellen des Immunsystems wie B-Zellen oder dendritischen Zellen im Rahmen der humoralen und zellulären Immunabwehr gegen Viren und Bakterien hin.

10 Nach Expression hat das 8F4-Molekül *in vitro* eine starke ko-stimulatorische Wirkung auf verschiedene Funktionen der T-Lymphozyten:

1. Deutliche Verstärkung der Proliferation von T-Lymphozyten.
2. Deutliche Verstärkung der Synthese bestimmter Zytokine durch die T-Lymphozyten.
- 15 3. Stark erhöhte Expression von Steuerungs-Molekülen, z.B. Oberflächenmoleküle und Zytokine, auf und in T-Lymphozyten.
4. Deutliche Verbesserung der T-Zell-induzierten Antikörper-Bildung (IgM und IgG) durch B-Zellen.

20 Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin bereit, ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon. Ein biologisch aktives Fragment oder Analogon ist ein Fragment oder Analogon, das ebenfalls eine ko-stimulatorische Wirkung auf T-Zellen-Lymphozyten zeigt oder zumindest im Sinne einer Blockade eine biologische Wirkung entfaltet. Bevorzugt ist ein Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon, das mindestens 60% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das erfindungsgemäße Polypeptid eine 25 Aminosäuresequenz, die mindestens 80% Homologie mit der 199 Aminosäuren umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon.

30

Insbesondere bevorzugt ist ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation

von T-Zellen und umfassend eine Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

Die Erfindung schließt alle allele-Varianten, Fragmente und Analoga von dem 8F4-Molekül.

5 Diese Varianten schließen ein natürlich vorkommende allele-Varianten, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Substitutionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren substituiert worden sind mit verschiedenen Aminosäuren, Deletionsanaloga, in denen eine oder mehrere Aminosäuren deletiert worden sind und Additionsanaloga, bei denen eine oder mehrere 10 Aminosäuren hinzugefügt worden sind. Deletion und Addition von einer oder mehreren Aminosäuren können entweder an einer internen Region des Polypeptids oder an dem Amino- oder Carboxyterminus gemacht werden.

15 Erfindungsgemäße Polypeptide, fusioniert zu heterogenen Polypeptiden, werden ebenfalls umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf DNA-Sequenzen, die ein erfundungsgemäßes Polypeptid oder ein biologisch aktives Fragment oder Analogon davon kodieren.

20

Diese DNA-Sequenzen schließen die Sequenz gemäß SEQ ID NO:1 (Fig. 16) genauso wie allele-Varianten, Fragmente, und Analoga mit biologischer Aktivität ein.

25 Bevorzugt ist eine DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
- b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
- c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen 30 in (a) und (b) hybridisieren. Vorzugsweise hybridisieren die vorstehenden DNA-Sequenzen zueinander unter stringenten Bedingungen.

Weiterhin werden bereitgestellt Vektoren, die diese DNA-Sequenzen enthalten und Wirtszellen, die mit diesen Vektoren transformiert oder transfiziert sind.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung monoklonale Antikörper gegen das 8F4-Molekül. Die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper können auf übliche Weise nach dem von Milstein und Köhler, *Nature* 256 (1975), 495-497, beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Insbesondere können die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper hergestellt werden, indem Mäuse mit T-Zellen, die *in vitro* mit Phorbolmyristacetat (PMA) und Ionomycin ("2-Signal-System") für 24 h aktiviert worden sind, immunisiert werden. Die Milzzellen der immunisierten Mäuse werden mit Myelom-Zellen fusioniert. 8F4-spezifische monoklonale Antikörper werden dadurch identifiziert, daß sie 2-Signal-aktivierte, jedoch nicht ruhende T-Lymphozyten erkennen. Auch färben 8F4-spezifischen Antikörper mit einem Signal (entweder PMA oder Ionomycin) stimuliert T-Zellen in einem auf übliche Weise durchgeführten Nachweisverfahren nicht an. 8F4-spezifische Antikörper ergeben ein typisches Anfärbemuster von tonsillären T-Zellen und erkennen ein Antigen von etwa 55 bis 60 kDa in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE und von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa in einer reduzierenden SDS-PAGE auf aktivierte T-Lymphozyten.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Hybridomzellen, die die erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper herstellen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung die Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des erfindungsgemäßen Polypeptids 8F4 hemmen, als Arzneimittel. Besonders bevorzugt ist Verwendung der erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörper, natürlicher oder synthetischer Liganden, Agonisten oder Antagonisten des 8F4-Moleküls. Diese Substanzen können als Arzneimittel verwendet werden, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten oder zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen. Die Blockade der Interaktion des 8F4-Antigens mit seinem Rezeptor verbessert z.B. die Verhinderung der Organabstoßung, da eine solche Blockade nur bereits aktivierte T-Lymphozyten betrifft. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Polypeptids als Arzneimittel. Insbesonders kann das erfindungsgemäße Polypeptid, zur Vorbeugung oder Therapie von Erkrankungen an denen das Immunsystem beteiligt ist, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV-oder HBV-Infektionen verwendet werden.

Das erfindungsgemäße Polypeptid kann ebenfalls auf übliche Weise in Zellen eingeführt werden, so daß diese Zellen das Polypeptid z.B. konstitutiv exprimieren. Z.B. kann die das Polypeptid codierende Nukleinsäuresequenz oder ein Vektor, umfassend die das Polypeptid 5 codierende Nukleinsäuresequenz, z.B. die cDNA oder genomische DNA, Promotoren, Enhancer und andere für die Expression der Nukleinsäuresequenz benötigten Elemente, in eine Zelle eingeschleust werden. Vorzugsweise wird die 8F4 cDNA (2641 Nukleotide), dargestellt in Fig. 16 (SEQ ID NO: 1), oder Fragmente oder Derivate hiervon zur Expression des erfindungsgemäßen Polypeptids oder Fragmenten hiervon eingesetzt.

10

Ferner kann das erfindungsgemäße Polypeptid z.B. mittels Liposomen in Zellen eingeführt werden, die das Polypeptid danach auf ihrer Zelloberfläche ausbilden. Erfindungsgemäß können diese Zellen als Arzneimittel verwendet werden, insbesondere zur Wiederherstellung 15 der korrekten Regulation des menschlichen Immunsystems, wie sie im Rahmen zahlreicher chronischer Infektionserkrankungen auftritt, z.B. im Rahmen von AIDS, Asthmaerkrankungen oder bei chronischen viralen Hepatitiden (z.B. HCV, HBV), oder zur Stimulation des Immunsystems *in vitro* oder *in vivo*, wie z.B. für die Therapie von Krebserkrankungen verwendet werden.

20

In einer weiteren Ausführungsform werden Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist verwendet, wobei die Substanzen insbesondere einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen. Zur Diagnose kann z.B. ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie 25 oder eine histochemische Anfärbung verwendet werden. Die Substanzen, die das erfindungsgemäße Polypeptid erkennen, umfassen auch Nukleinsäuresequenzen, wobei diese vorzugsweise zur Hybridisierung und/oder zur Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Amplifikation (z.B. PCR) eingesetzt werden.

30

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des erfindungsgemäßen Polypeptids in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) und die Verwendung dieser Substanzen als Arzneimittel.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Substanzen, die die

Heraufregulation des erfindungsgemäßen Polypeptids an die T-Zelloberfläche verhindern und deren Verwendung als Arzneimittel.

5 In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Polypeptid oder Fragmente hiervon durch ein transgenes Tier exprimiert.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt die Erfindung ein transgenes Tier, bei dem das Gen, das für das erfindungsgemäße Polypeptid kodiert, ausgeschaltet worden ist („Knock-out“)

10

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung:

15 Fig. 1 zeigt das Ergebnis einer Immunpräzipitation des 8F4-Antigens aus aktivierten humanen T-Zellen. (a) Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE; 12% Polyacrylamidgel (PAA-Gel)) reduzierend, (b) SDS-PAGE (10% PAA-Gel) nicht reduzierend. Angegeben sind die Bedingungen zur Elution des Antigens von der 8F4-Matrix. "SDS" bedeutet Natriumdodecylsulfat; "DTT" bedeutet Dithiothreitol, "Mr" bedeutet Molekulargewicht und "kDa" bedeutet Kilodalton.

20 Fig. 2a zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen ist in Klammern angegeben. "PMA" bedeutet Phorbolmyristacetat; "PHA" bedeutet Phytohaemagglutinin; "OKT3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD3; "MLR" bedeutet gemischte Lymphocytenreaktion (engl.: *mixed lymphocyte reaction*); "mAK 9.3" ist ein monoklonaler Antikörper gegen CD28; 25 "SEB" bedeutet Staphylokokken Enterotoxin B.

Fig. 2b zeigt das Ergebnis einer Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin in einer Durchflußzytometrie. Aufgetragen ist die Immunfluoreszenz (log) gegen die Zellzahl.

30

Fig. 3 zeigt das Ergebnis einer Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind. "bio" bedeutet biotinylierter Antikörper.

Fig. 4 zeigt das Ergebnis einer histochemischen Untersuchung zur Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

5 Fig. 5 zeigt das Ergebnis einer Expressions-Analyse von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen in einer Durchflußzytometrie. "bioPE" bedeutet biotinylierter Antikörper und Streptavidin-Phycoerythrin Sekundärreagenz.

10 Fig. 6 zeigt die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern (CD69, CD45) in einer Durchflußzytometrie.

15 Fig. 7 zeigt schematisch die verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4. Offene Kreise (O) stehen für 8F4 Antikörper; Dreiecke (◆) stehen für unspezifischer Antikörper gleichen Isotyps; ausgefüllte Kreise (●) stehen für anti-CD28-Antikörper-9.3.

20 Fig. 8 zeigt einen schematischen Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28. "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper; "ATAC" bedeutet "Activation induced And Chemokine related"; "cpm" bedeutet radioaktive Zerfälle pro Minute.

25 Fig. 9 zeigt schematisch die Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen. "ng" bedeutet Nannogramm; "ml" bedeutet Milliliter; "mAk" bedeutet monoklonaler Antikörper.

Fig. 10 zeigt schematisch die Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-Stimulation durch 8F4.

30 Fig. 11 zeigt die Expression des 8F4-Antigens auf der MOLT-4V-Zelllinie. MOLT-4V-Zellen wurden mit einem Fluorescein-markierten 8F4-Antikörper (8F4-FITC) gefärbt und in der Durchflußzytometrie untersucht (offene Linie, im Vergleich zu einer Isotypkontrolle (ausgefüllte Linie)).

Fig. 12 zeigt die zweidimensionale Gelelektrophorese. Ein MOLT-4V Zell-Lysat aus  $300 \times 10^6$  Zellen wurde wie beschrieben immunpräzipitiert. Das Eluat wurde auf einer nicht

reduzierenden SDS-PAGE (10% PAA) aufgetrennt und der Bereich um 60 kDa aus dem Gel herausgeschnitten. Zur Reduktion der Disulfidbrücken im 8F4-Molekül wurde das Gelstück für 1 h bei 50°C in 5,3 M Harnstoff, 0,5 M Tris, pH 8,0, 1% SDS, 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol inkubiert und die freien Cysteinreste im Molekül mit 10 mM Iodoacetamid (Sigma, Deisenhofen) alkyliert (30 min, 37°C). Das Gelstück wurde für weitere 30 min. in 1× SDS-PAGE Probenpuffer equilibriert und auf einem 12% PAA-SDS-Gel (mit Sammelgel) montiert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel einer Silberfärbung unterzogen. Die Lage des 8F4-Proteins wurde durch Oberflächeniodinierung bestimmt (vgl. Fig. 1) und ist durch Umkreisung markiert. (Alle nicht im Detail beschriebenen Prozeduren wurden nach Standardmethoden durchgeführt, siehe z.B. Westermeier, R., Electrophoresis in Practice, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1997).

Fig. 13 zeigt eine Hybridisierung mit Oligo 1 (SEQ ID NO:3). Auf Nitrocellulose-Filter immobilisierte Lamda-Klone wurden mit Oligo 1 wie in den Beispielen beschrieben 15 hybridisiert. Dargestellt ist die Exposition auf einem Röntgenfilm (Ausschnitt).

Fig. 14 zeigt eine Northern-Blot Analyse mit der 8F4-cDNA. Die Hybridisierung eines Northern-Blots mit der 8F4-cDNA ergibt eine Bande, die im Gel zwischen der 18S und 28S RNA läuft. In Fig. 14A ist das Verhalten als 2-Signal-abhängiges (s.o.) Aktivierungsantigen 20 gezeigt: Keine Expression in ruhenden lymphoiden Zellen (PBL), starke Expression in PMA+Ionomycin aktivierten CD4+ T-Zellen und deutlich verringerte Expression mit PMA bzw. Ionomycin alleine. Fig. 14B zeigt die Expressionsstärke der mRNA nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (T-Zellen (über Nylonwolladhärenz aufgereinigt, NTC), stimuliert mit PMA+Ionomycin). Daneben die MOLT-4-Zelllinien (ATCC CRL-1582), die 25 nur eine minimale Expression zeigt, ganz rechts die für die Klonierung verwendete MOLT-4V, die ein deutliches Signal zeigt. Aufgetragen ist außerdem die RNA weiterer Zelllinien, auf denen in der durchflußzytometrischen Analyse keine 8F4-Expression nachweisbar war: CEM (ATCC CCL-119), HUT-102 (ATCC TIB-162), HUT-78 (ATCC TIB-161), Jurkat (ATCC TIB-152), DG75 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) 30 ACC83), Karpas 299 (Fischer, P. et al. (1988), Blood, 72:234-240), DEL (Barbey, S. et al. (1990), Int. J. Cancer, 45:546-553)

Fig. 15 zeigt die Aminosäuresequenz des Polypeptids 8F4 (SEQ ID NO:2).

Fig. 16 zeigt die 8F4 cDNA (SEQ ID NO:1).

Die nachstehenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht einschränkend zu verstehen.

5

Beispiel 1: Generierung des 8F4-Antikörpers

Balb/c Mäuse wurden mit humanen T-Zellen immunisiert, welche vorher für 24 h mit 33 ng/ml des Phorbolesters Phorbolmyristacetat (PMA), (Sigma, Deisenhofen), und mit 200 10 ng/ml des  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin (Sigma, Deisenhofen) aktiviert worden sind (sogenannte "2-Signal-Aktivierung"). Nach dreimaligem Boostern wurden die Milzzellen der Mäuse mit dem Myelom P3X63Ag8.653 (ATCC Nr.CRL-1580) fusioniert und Antikörpersezernierende Hybridome nach Standardmethoden generiert; vgl. Peters und Baumgarten, Monoclonal Antibodies. Springer, Heidelberg, 1992. Das Durchmustern der erhaltenen 15 Antikörper erfolgte auf aktivierten versus ruhenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie. Aktivierte ("2-Signal-Aktivierung") und ruhende T-Zellen wurden mit dem Hybridomüberstand inkubiert und anschließend mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper markiert; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995. Nur die Antikörper, welche Moleküle erkannten, die ausschließlich durch PMA und das 20  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors Ionomycin auf der T-Zell-Oberfläche induziert wurden, jedoch nicht durch eines der Agenzien alleine ("2-Signal-Moleküle") wurden für eine weitere Reinigung ausgewählt. Die erhaltenen Antikörper wurden in der Durchflußzytometrie auf Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit zu bekannten Antikörpern gegen Aktivierungsmoleküle (vgl. Tabelle 1) 25 auf T-Zellen untersucht. Kriterien waren hierbei neben der schon oben erwähnten "2 Signal-Abhängigkeit" die Kinetik der Induktion auf stimulierten T-Zellen und die Expression auf verschiedenen Zelllinien.

Beispiel 2: Immunpräzipitation des 8F4-Antigens

30 Oberflächenmoleküle von aktivierten humanen T-Zellen wurden mit  $^{125}\text{I}$  nach Standardmethoden iodiniert und mit dem Antikörper 8F4 nach Standardmethoden immunpräzipitiert; vgl. Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice. Academic Press, London, 1996. Für die Immunpräzipitation wurde der Antikörper nach Schneider et al., *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982), 10766-10769, an Protein G (Pharmacia, 35 Freiburg) gekoppelt (8F4-Matrix). Das Waschen der Matrix erfolgte nach Schneider et al.,

siehe vorstehend. Das immunpräzipitierte 8F4-Molekül wurde auf übliche Weise in der SDS-PAGE (nicht reduziert und reduziert) auf seine molekulare Masse analysiert; Goding, siehe vorstehend.

5 **Beispiel 3: Durchflußzytometrie**

Die Analyse der 8F4-tragenden T-Zellen in der Durchflußzytometrie erfolgte nach Standardmethoden; vgl. Shapiro, Practical Flow Cytometry. Wiley-Liss, New York, 1995.

10 Ausführungsbeispiel 3.1: Durchflußzytometrie nach Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen.

CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Agenzien in üblicher Weise stimuliert und auf Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie nach 15 üblichem Verfahren untersucht. Die Aktivierungsdauer der T-Zellen betrug mit den verschiedenen Agenzien zwischen 24 Stunden und 144 Stunden. Aktivierungsmodi: Phorbolmyristataacetat (PMA; 33 ng/ml), Ionomycin (200ng/ml), Phytohaemagglutinin (PHA 1,5 mg/ml), OKT3 (monoklonaler Antikörper gegen CD3), gemischte Lymphocytenreaktion (MLR, "mixed lymphocyte reaction" zwischen 50 000 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und 100 000 B-Zellen), 20 mAk 9.3 (monoklonaler Antikörper gegen CD28), Staphylokokken Enterotoxin B (SEB, 0,1 ng/ml). Die Auswertung ergab, daß verschiedene Stimuli geeignet sind, das 8F4-Molekül auf T-Zellen zu induzieren, jedoch in unterschiedlicher Expressionsdichte. Am potenteren sind neben den stark wirksamen pharmakologischen Agenzien PMA und Ionomycin solche Stimuli, die eine ko-stimulatorische Situation darstellen, wie z.B. akzessorische Zellen in der 25 MLR oder der ko-stimulierende mAk 9.3.

Ausführungsbeispiel 3.2: Kinetik der Induktion des 8F4-Antigens auf CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nach Aktivierung mit PMA und Ionomycin.

30 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit PMA (33 ng/ml) und Ionomycin (200 ng/ml) in üblicher Weise stimuliert und nach 0, 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie in üblicher Weise untersucht. Das Molekül ist bereits nach vier Stunden auf der Oberfläche detektierbar, gehört also zur Klasse der relativ frühen Aktivierungsantigene. Auch nach 48 Stunden wird das Antigen noch gut

exprimiert.

**Ausführungsbeispiel 3.3: Durchflußzytometrie zur Identifikation von Molekülen, welche an der Induktion von 8F4 in der "mixed lymphocyte reaction" beteiligt sind.**

5

50 000 CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit 100 000 allogenen tonsillären B-Zellen für 6 Tage ko-kultiviert (37°C, 5,2% CO<sub>2</sub>, 200 µl RPMI 1640 mit 10% FCS in 96-Well-Rundbodenplatten) und danach auf die Expression des 8F4-Moleküls in der Durchflußzytometrie untersucht. Zu Beginn der Kultivierung wurden verschiedene Antikörper (anti-CD80, anti-CD86, anti-MHCII; alle 10 mg/ml) der Kultur hinzugefügt, um die Abhängigkeit der 8F4-Induktion von diesen Molekülen zu überprüfen. Die Expression von 8F4 lässt sich nur durch Blockade der CD86/CD28-Interaktion blockieren, nicht jedoch durch Blockade von CD80. Der Blockade-Effekt ist hierbei noch stärker als die Blockade von MHCII (Positivkontrolle).

10

15 Ausführungsbeispiel 3.4: Expression von 8F4 auf T- und B-Zellen aus humanen Tonsillen. B-Zellen bzw. T-Zellen aus tonsillärem Gewebe von verschiedenen Quellen wurden auf übliche Weise gereinigt und in der Durchflußzytometrie auf die Expression des 8F4-Moleküls untersucht. Während auf B-Zellen das Signal nicht eindeutig signifikant war, exprimierten 20 etwa 50-80% der tonsillären T-Zellen das 8F4-Molekül in unterschiedlicher Dichte. Es lassen sich hierbei zwei Populationen unterschiedlich hoher Fluoreszenz (8F4-"high" bzw. -"low") erkennen, deren Ausprägung bei den verschiedenen Tonsillen unterschiedlich ist. So weist z.B. Tonsillen eine ausgeprägte 8F4-"low"- und andere Tonsillen eine ausgesprochene 8F4-"high"-Population auf.

25

Ausführungsbeispiel 3.5: Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern.

Aus humanen Tonsillen gereinigte T-Zellen wurden in der 2-Farben-Durchflußzytometrie auf die Ko-Expression des 8F4-Moleküls mit anderen Aktivierungsmarkern analysiert. In 30 Tonsillen wird 8F4 ko-exprimiert mit CD69 wie auch mit Varianten des CD45-Moleküls. Hierbei sind die 8F4-"high"-Zellen eindeutig mit einer CD45RO-Expression korreliert, während die 8F4-negativen Zellen den Phänotyp CD45RA tragen. CD45RA wird hauptsächlich von sogenannten "naiven" T-Zellen exprimiert, wohingegen CD45RO mit einer Effektorzellfunktion assoziiert ist. Es handelt sich also bei den 8F4<sup>+</sup>-Zellen hauptsächlich um

"reife" T-Zellen. CD45RO und CD45RA sind Isoformen von CD45.

Beispiel 4: Lokalisation von 8F4-positiven Zellen in der Tonsille.

5 Tonsilläres Gewebe in Gefrierschnitten wurde mit dem 8F4-Antikörper in der APAAP-Technik (alkalische-Phosphatase-anti-alkalische-Phosphatase) nach Standardverfahren angefärbt. 8F4<sup>+</sup>-Zellen wurden vorzugsweise im Keimzentrum der Tonsillen vorgefunden, aber z. T. auch in der T-Zell-Zone der Tonsillen.

10 Beispiel 5: Ko-Stimulation von T-Lymphozyten

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT3 (verschiedene Verdünnungen eines Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) 15 beladen. Als Isotypkontrolle wurden der OKM1 Antikörper oder der 2A11 Antikörper (beide 2 µg/ml) verwendet.

Ausführungsbeispiel 5.1: Verstärkte Expression von Aktivierungsmolekülen auf T-Lymphozyten nach Ko-Stimulation durch 8F4.

20 Gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden mit verschiedenen Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers OKT3 aktiviert und gleichzeitig mit dem 8F4-Antikörper oder einem unspezifischen Antikörper gleichen Isotyps ko-stimuliert. Als Vergleich wurde die Ko-Stimulation mit dem anti-CD28-Antikörper-9.3, einem der stärksten 25 bekannten ko-stimulatorischen Antikörper, durchgeführt. Selbst bei optimaler Stimulation über CD3 ist sowohl mit dem mAk 8F4 als auch mit mAk 9.3 noch ein Ko-stimulatorischer Effekt zu sehen. Im suboptimalen OKT3-Bereich, d.h. dem Bereich, in dem ohne Ko-stimulation keine volle T-Zellaktivierung mehr erzielt werden kann, können beide Antikörper die Expression anderer Aktivierungsantigene um den Faktor 4 bis 100 steigern, wobei die 30 Wirkung des anti-CD28-Antikörpers auch noch bei sehr hohen OKT3-Verdünnungen sichtbar wird. Dies ist darauf zurückzuführen, daß bei sehr schwacher OKT3-Stimulation das 8F4-Antigen nicht mehr auf die Zelloberfläche gebracht und somit auch nicht vom mAk 8F4 kreuzvernetzt werden kann.

Ausführungsbeispiel 5.2: Vergleich der ko-stimulierenden Wirkung von 8F4 mit der ko-stimulierenden Wirkung von CD28.

Gereinigte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden für 51 h mit einer suboptimalen Konzentration des 5 monoklonalen Antikörpers OKT3 stimuliert. Als Ko-Stimulatoren wurden Antikörper 8F4, Antikörper 9.3 (anti-CD28) und Isotypkontrollen eingesetzt (jeweils 2 µg/ml). Nach Ablauf der Stimulationsdauer wurde die Proliferationsrate der T-Zellen durch <sup>3</sup>H-Thymidin-Einbau bestimmt. In Parallelkulturen wurde der Überstand entfernt und die Konzentration der 10 Zytokine ATAC/Lymphotactin und IL-2 bestimmt. Bezuglich der IL-2-Synthese unterscheiden sich 8F4 und CD28 sehr stark voneinander. CD28-Ko-Stimulation führt, wie 15 auch im Stand der Technik beschrieben (Chambers und Allison, *Current Opinion in Immunology* 9 (1997), 396-404), zu einer sehr starken IL-2 Sekretion. Mit 8F4 hingegen liegt die IL-2 Produktion unterhalb der Nachweisgrenze. Die Proliferation ist jedoch in beiden Ansätzen vergleichbar, das autokrine Wachstum der T-Zellen muß also bei 8F4-Ko- 20 Stimulation auf andere Faktoren zurückgeführt werden. Auch in bezug auf die Sekretion des Lymphokins ATAC unterscheiden sich die beiden Antikörper in der ko-stimulatorischen Wirkung kaum.

Beispiel 6: Bestimmung der von B-Zellen synthetisierten Immunglobuline nach Interaktion mit 20 8F4-ko-stimulierten T-Zellen

96-Well-Platten wurden mit einem Ziegen-anti-Maus-Ig-Antikörper beschichtet (20 µg/ml), gewaschen, und mit dem anti-CD3 monoklonalen Antikörper OKT 3 (1:500 bis 1:80 000 Aszites) und dem erfindungsgemäßen 8F4-Antikörper (2 µg/ml) beladen. Als Isotypkontrolle 25 wurde der OKM1-Antikörper oder der 2A11-Antikörper verwendet. In einigen Experimenten wurde zum Vergleich eine Ko-Stimulation mit einem CD28-spezifischen Antikörper ("9.3") durchgeführt; vgl. Hara et al., *Journal of Experimental Medicine* 161 (1985), 1513-1524. In die so vorbehandelten Kulturplatten wurden pro well 50 000 gereinigte (Magnetobeads, Dynal, Hamburg) CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (>95% Reinheit) aus dem peripheren Blut und 25 000 30 allogene tonsilliäre B-Zellen (negativ-Selektion durch T-Zell-Rosettierung mit Schafserthrocyten, 96% Reinheit) pipettiert und für 8 Tage ko-kultiviert. Nach dieser Zeitdauer wurde der Überstand entnommen und auf die Konzentration sezernierter Immunglobuline vom IgM- und IgG-Typ im ELISA auf übliche Weise analysiert; vgl. Nishioka and Lipsky, *Journal of Immunology* 153 (1994), 1027-1036.

Ausführungsbeispiel 6.1: Verstärkung der Synthese der Antikörper vom IgM- und IgG-Typ durch die B-Zellen nach Ko-Stimulation von T-Zellen.

Gereinigte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden für 8 Tage mit allogenen B-5 Zellen aus Tonsillen in üblicher Weise ko-kultiviert. Bei einer suboptimalen Stimulation der T-Zellen mit dem OKT3-Antikörper verstärkt die Ko-Stimulation der T-Zellen durch 8F4 die Sekretion der IgM- und IgG-Immunglobuline um den Faktor 40.

Beispiel 7: Verhinderung der aktivierungsinduzierten Apoptose peripherer T-Zellen nach Ko-10 Stimulation durch 8F4.

Periphere T-Zellen (über Nylonwolladhärenz in üblicher Weise aufgereinigt) wurden für 20 h mit PHA (1.5 mg/ml) stimuliert und über 6 Tage mit IL-2 kultiviert. Anschließend wurden die 15 Zellen durch OKT3 mit und ohne Ko-Stimulation durch mAk 8F4 (2 µg/ml) restimuliert. Die Apoptose wurde durch Anfärbung der DNA mit Propidiumiodid in der Durchflußzytometrie (FACS) bestimmt. Bei suboptimaler Stimulation über den T-Zellrezeptor-Komplex kann Ko-Stimulation über 8F4 den Anteil apoptotischer Zellen um den Faktor 4 senken.

Beispiel 8: Klonierung der für das 8F4-Protein kodierenden cDNA

20 Durch Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten 8F4 Antikörper wurde in der Durchflußzytometrie eine Zelllinie (MOLT-4V) identifiziert, die das 8F4-Antigen konstitutiv exprimiert (Fig. 11). Bei der Linie MOLT-4V handelt es sich um eine Variante der humanen T-Zelllinie MOLT-4 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1582).

25 Diese Zelllinie wurde für die präparative Aufreinigung des 8F4-Antigens mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers verwendet:

Die Zellen wurden im großen Maßstab (150 l) in Rollerkulturflaschen kultiviert, abzentrifugiert und die zellulären Proteine mit einem Lysepuffer (50 mM Tris, pH 8,0, 150 30 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF (Sigma, Deisenhofen), 1% NP-40 (Boehringer, Mannheim)) extrahiert. Zellkerne und andere unlösliche Bestandteile wurden durch Ultrazentrifugation entfernt. Das so gewonnene Zell-Lysat wurde für 2 h mit Sepharose CL4-B (Pharmacia, Freiburg) präinkubiert, um unspezifisch an Sepharose bindende Proteine zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit der bereits in Beispiel 2 beschriebenen

8F4-Immunaffinitätsmatrix (4 h bei 4°C). Die Matrix wurde in eine Säule gefüllt und nun mehrfach unter Bedingungen gewaschen, die eine ausschließliche Entfernung von unspezifisch bindenden Proteinen bedingt (1. 50 mM Tris, pH 8,0, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40; 2. 50 mM Tris, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% NP-40, 0,1% SDS; 3. 0,2 M Glycin pH 4,0, 0,5% CHAPS (Merck, Darmstadt)). Die Elution des 8F4-Antigens von der Matrix erfolgte mit 0,2 M Glycin, pH 2,5, 0,5% CHAPS. Das Eluat wurde durch Ultrafiltration eingeengt (Amicon Centricon 10, Millipore, Eschborn).

Um eine weitere Aufreinigung des 8F4 Moleküls zu erzielen, wurde die dimere Struktur des Moleküls (siehe Fig. 1) in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese (nicht reduzierend/reduzierend) ausgenutzt: Da die meisten Proteine als Monomer vorkommen, laufen sie in der Gelelektrophorese auf einer Diagonale, das 8F4-Molekül dagegen läuft in der 1. Dimension (nicht reduzierend) bei 55-60 kDa und in der 2. Dimension (reduzierend) bei 27 und 29 kDa (Fig. 12).

Für die präparative Auftrennung wurden die Immunpräzipitate von jeweils  $20 \times 10^9$  Zellen wie vorstehend bei der Beschreibung der Fig. 12 dargestellt in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennt, das Gel mit Coomassie Blau G250 (Biorad, München) gefärbt und die in Fig. 12 bezeichneten Areale aus dem Gel getrennt ausgeschnitten (8F4-27kDa bzw. 8F4-29 kDa).

Für die Peptidmikrosequenzierung wurden die Proteine aus jeweils 4 Gelstücken mit Trypsin verdaut und aus dem Gel eluiert. Die tryptischen Fragmente wurden über HPLC aufgetrennt und einzelne Fraktionen einer Edman-Degradation unterzogen (Verfahren ausführlich beschrieben in Groettrup, M. et al. (1996), Eur. J. Immunol., 26:863-869).

Aus der Sequenzierung der 8F4-29kDa Probe wurde neben Bruchstücken bekannter Proteine eine Peptidsequenz XRLTDVT gefunden, für die in sämtlichen Proteindatenbanken kein Korrelat im humanen Bereich gefunden wurde.

30

Eine eindeutige Rückübersetzung einer Proteinsequenz in eine DNA-Sequenz ist nicht möglich. So ergibt die Rückübersetzung der obigen Peptidsequenz in ein Oligonucleotid mit 17 Nucleotiden eine Zahl von 2048 Permutationen. Ein spezielles Verfahren (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) ermöglicht jedoch das Screening einer cDNA Bank

mit degenerierten Oligonucleotiden. Auf Basis der gefundenen Peptidsequenz wurden 2 Oligonucleotide (Oligo 1 (SEQ ID NO:3): MGN CTS ACN GAY GTN AC, 512 Permutationen; Oligo 2 (SEQ ID NO:4): MGN YTD ACN GAY GTN AC, 1024 Permutationen) synthetisiert.

5

Für das Screening wurde eine cDNA Bank aus der auch für die Proteinaufreinigung verwendeten MOLT-4V Zelllinie konstruiert:

Gesamt-RNA wurde nach der Guanidinium/CsCl-Methode (Chirgwin, J.M. et al. (1979), Biochemistry 18:5294-5299) isoliert, mRNA über Oligo-dT-Cellulose-Säulen (Gibco BRL, 10 Eggenstein) angereichert. Die Erst- und Zweit-Strang cDNA Synthese wurde unter Verwendung eines kommerziellen cDNA-Synthesesystems (Gibco BRL, Eggenstein) unter Verwendung von Oligo-dT-Primern nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die cDNA wurde über EcoRI-Adaptoren in den Lambda ZAPII Vektor (Stratagene, Heidelberg) ligiert.

15

Die cDNA-Bank wurde gemäß Standardmethoden (Vogeli, G. and Kaytes, P.S. (1987), Methods Enzymol., 152:407-515) plattiert und die Lamda-DNA auf Nitrocellulose-Filters (Optitran BA-S 85, Schleicher & Schuell, Dassel) immobilisiert.

Die oben genannten Oligonucleotide wurden unter Verwendung von T4 Polynucleotidkinase (NEBL, Schwalbach) und  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (NEN Du Pont, Brüssel) radioaktiv markiert (Wallace, 20 R.B. and Miyada, C.G. (1987), Methods Enzymol., 152:432-442).

Die Hybridisierung der Filter erfolgte in einem für degenerierte Oligonucleotide beschriebenen Puffer (Wozney, J.M. (1990), Methods Enzymol. 182:738-751) mit 3 M 25 Tetramethylammoniumchlorid (Roth, Karlsruhe) bei 48°C. Die Filter wurden, wie in der o.g. Referenz beschrieben, gewaschen, wobei die Waschtemperatur 50°C betrug. Nach Exposition der Filter auf einem Röntgenfilm zeigten sich ca. 50 positive Klone pro 100 000 plattierter Phagen (Fig. 13).

30 6 Klone wurden weiter charakterisiert, indem sie nach der vom Herstellers des Vektors (Stratagene, Heidelberg) beschriebenen Methode durch in vivo Excision in einen Plasmidvektor überführt wurden und mit T3 und T7 Primern ansequenziert wurden (BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Foster City, USA). Einer der Klone enthielt eine Sequenz, deren Translation genau die gesuchte Peptidsequenz ergab. Dieser Klon

wurde zur Hybridisierung eines Northern Blots (Fig. 14) verwendet (Kroczek, R.A. (1993), J. Chromatogr., 618, 133-145). Das Expressionsmuster der mRNA entsprach genau der Expression des 8F4-Moleküls, wie es aus durchflußzytometrischen Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper bekannt war. Da der gefundene Klon nur das 3'-Ende der gesuchten 5 cDNA enthielt, wurde ein 5'-gelegenes Fragment zur Isolierung der gesamten 8F4 cDNA verwendet. Mehrere Klone wurden auf beiden Strängen sequenziert.

Die 8F4 cDNA (2641 Nucleotide) ist in Fig. 16 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:1 dargestellt und codiert für ein Protein mit 199 Aminosäuren (Nucleotide 68-664), dargestellt 10 in Fig. 15 und im Sequenzprotokoll unter SEQ ID NO:2. Die Sequenzierung mehrerer unabhängiger Klone aus der cDNA-Bank ergab einige Abweichungen von der hier gezeigten Sequenz, die jedoch alle in der 3'-untranslatierten Region liegen:

- Pos. 909-910: Deletion
- Pos. 1631: T->C
- 15 Pos. 2074: G->T
- Pos. 2440: G->C
- Pos. 2633: alternative Polyadenylierungsstelle

Tab.1:

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die verwendeten Antikörper (Klon), deren Herkunftsquelle (Quelle), die Spezifität gegen ihr jeweiliges Antigen (Spezifität) und gegebenenfalls ihre Markierung (Label) wider.

Spezifität	Label	Isotyp	Klon	Quelle
CD3	Cy-Chrome	IgG1	UCHT1	Pharmingen, Hamburg
CD3	-	IgG2a	OKT3	ATCC CRL-8001
CD11b	-	IgG2b	OKM1	ATCC CRL-8026
CD25	FITC	IgG2a	B1.49.9	Immunotech, Hamburg
CD28	-	IgG2a	9.3	Immunex Corp., Seattle
CD45RA	Cy-Chrome	IgG2b	HI100	Pharmingen, Hamburg
CD45RO	FITC	IgG2a	UCHL1	Immunotech, Hamburg
CD69	FITC	IgG1	FN50	Pharmingen, Hamburg
CD80	-	IgG1	L307.4	Becton Dickinson, Heidelberg
CD86	-	IgG2b	IT2.2	Pharmingen, Hamburg
CD154	FITC	IgG1	TRAP-1	Hybridom <sup>1</sup>
MHCII	-	IgG2a	L243	ATCC HB-55
8F4	-	IgG1	8F4	Hybridom <sup>1</sup>
8F4	Biotin	IgG1	8F4	Hybridom <sup>1</sup>
Isotyp IgG1	-	IgG1	2A11	Hybridom <sup>1,2</sup>
Isotyp IgG1	FITC	IgG1	2A11	Hybridom <sup>1,2</sup>
Isotyp IgG1	Biotin	IgG1	ASA-1	Hybridom <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Die Hybridomzelllinie wurde auf übliche Weise generiert, der Antikörper aufgereinigt und gegebenenfalls markiert.

<sup>2</sup> gerichtet gegen ein synthetisches Peptid

Die in den Beispielen verwendeten Antiseren und Sekundärreagenzien wurden bezogen von: Ziege-anti-Maus-Ig, FITC-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA;

Streptavidin, PE-konjugiert, von Jackson Immuno Research Lab., USA; Kaninchen-anti-Maus-Ig-Fraktion, von Sigma, Deisenhofen.

SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE ANGABEN:

5

## (i) ANMELDER:

(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland, letztvertreten  
durch  
den Direktor des Robert-Koch-Instituts

(B) STRASSE: Nordufer 20

(C) ORT: Berlin

(D) BUNDESLAND: Berlin

(E) LAND: Deutschland

(F) POSTLEITZAHL: 13353

15

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ko-stimulierendes Polypeptid von T-Zellen, monoklonale Antikörper sowie die Herstellung und deren Verwendung

20

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4

## (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRAEGER: Floppy disk

(B) COMPUTER: IBM PC compatible

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

## (v) DATEN DER JETZIGER ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER:

30

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

## (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 2641 Basenpaare

(B) ART: Nucleotide

(C) STRANGFORM: Doppelstrang

(D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜELS: cDNA

40

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CGAGAGCCCTG AATTCACTGT CAGCTTGAA CACTGAACGC GAGGACTGTT AACTGTTCT	60
GGCAAACATG AAGTCAGGCC TCTGGTATTT CTTTCTCTTC TGCTTGCAGCA TTAAAGTTTT	120
AACAGGAGAA ATCAATGGTT CTGCCAATTA TGAGATGTTT ATATTCACA ACGGAGGTGT	180
ACAAATTGTA TGCAAATATC CTGACATTGT CCAGCAATTT AAAATGCAGT TGCTGAAAGG	240
GGGGCAAATA CTCTGCGATC TCACTAAGAC AAAAGGAAGT GGAAACACAG TGTCCATTAA	300
GAGTCTGAAA TTCTGCCATT CTCAGTTATC CAACAAAGT GTCTTTTT TTCTATACAA	360
CTTGGACCAT TCTCATGCCA ACTATTACTT CTGCAACCTA TCAATTTTG ATCCTCCTCC	420
TTTTAAAGTA ACTCTTACAG GAGGATATTT GCATATTAT GAATCACAAC TTTGTTGCCA	480
GCTGAAGTTC TGGTTACCCA TAGGATGTGC AGCCTTGTT GTAGTCTGCA TTTTGGGATG	540
CATACTTATT TGGTGGCTTA CAAAAAAGAA GTATTCATCC AGTGTGCACG ACCCTAACGG	600

23

TGAATACATG	TTCATGAGAG	CAGTGAACAC	AGCCAAAAAA	TCTAGACTCA	CAGATGTGAC	660	
CCTATAATAT	GGAACCTCTGG	CACCCAGGCA	TGAAGCACGT	TGGCCAGTTT	TCCTCAACTT	720	
5	GAAGTGCAAG	ATTCTCTTAT	TTCCGGGACC	ACGGAGAGTC	TGACTTAACT	ACATACATCT	780
TCTGCTGGTG	TTTGTTCAA	TCTGGAAGAA	TGACTGTATC	AGTCAATGGG	GATTTTAACA	840	
10	GACTGCCTTG	GTACTGCCGA	GTCCTCTCAA	AACAAACACC	CTCTTGCAAC	CAGCTTGGA	900
GAAAGCCCAG	CTCCTGTGTG	CTCACTGGGA	GTGGAATCCC	TGTCTCCACA	TCTGCTCCTA	960	
GCAGTGCATC	AGCCAGTAAA	ACAAACACAT	TTACAAGAAA	AATGTTTAA	AGATGCCAGG	1020	
15	GGTACTGAAT	CTGCAAAGCA	AATGAGCAGC	CAAGGACCAG	CATCTGTCCG	CATTTCACTA	1080
TCATACTACC	TCTTCTTTCT	GTAGGGATGA	GAATTCCCT	TTAATCAGT	CAAGGGAGAT	1140	
20	GCTTCAAAGC	TGGAGCTATT	TTATTTCTGA	GATGTTGATG	TGAACTGTAC	ATTAGTACAT	1200
ACTCAGTACT	CTCCTTCAAT	TGCTGAACCC	CAGTTGACCA	TTTACCAAG	ACTTTAGATG	1260	
CTTTCTTGTG	CCCTCAATT	TCTTTTAAA	AATACTTCTA	CATGACTGCT	TGACAGCCCA	1320	
25	ACAGCCACTC	TCAATAGAGA	GCTATGTCTT	ACATTCTTC	CTCTGCTGCT	CAATAGTTT	1380
ATATATCTAT	GCATACATAT	ATACACACAT	ATGTATATAA	AATTCTATAAT	GAATATATTT	1440	
30	GCCTATATTC	TCCCTACAAG	AATATTTTG	CTCCAGAAAG	ACATGTTCTT	TTCTCAAATT	1500
CAGTTAAAAT	GGTTTACTTT	GTTCAAGTTA	GTGGTAGGAA	ACATTGCCCG	GAATTGAAAG	1560	
CAAATTTATT	TTATTATCCT	ATTTCTACC	ATTATCTATG	TTTCATGGT	GCTATTAATT	1620	
35	ACAAGTTAG	TTCTTTTGT	AGATCATATT	AAAATTGCAA	ACAAAATCAT	CTTTAATGGG	1680
CCAGCATTCT	CATGGGGTAG	AGCAGAATAT	TCATTTAGCC	TGAAAGCTGC	AGTTACTATA	1740	
40	GGTTGCTGTC	AGACTATACC	CATGGTGCCT	CTGGGCTTGA	CAGGTCAAAA	TGGTCCCCAT	1800
CAGCCTGGAG	CAGCCCTCCA	GACCTGGGTG	GAATTCCAGG	GTTGAGAGAC	TCCCCTGAGC	1860	
CAGAGGCCAC	TAGGTATTCT	TGCTCCCAGA	GGCTGAAGTC	ACCCCTGGAA	TCACAGTGGT	1920	
45	CTACCTGCAT	TCATAATTCC	AGGATCTGTG	AAGAGCACAT	ATGTGTCAAG	GCACAATTCC	1980
CTCTCATAAA	AACCACACAG	CCTGGAAATT	GGCCCTGGCC	CTTCAAGATA	GCCTTCTTTA	2040	
50	GAATATGATT	TGGCTAGAAA	GATTCTAAA	TATGTGGAAT	ATGATTATTC	TTAGCTGGAA	2100
TATTTCTCT	ACTTCCTGTC	TGCATGCCCA	AGGCTTCTGA	AGCAGCCAAT	GTCGATGCAA	2160	
CAACATTGT	AACTTTAGGT	AAACTGGGAT	TATGTTGTAG	TTAACACATT	TGTAACGTG	2220	
55	TGCTTATAGT	TTACAAGTGA	GACCCGATAT	GTCATTATGC	ATACTTATAT	TATCTTAAGC	2280
ATGTGTAATG	CTGGATGTGT	ACAGTACAGT	ACTGAACTTG	TAATTGAAAT	CTAGTATGGT	2340	
60	GTTCCTGTTT	CAGCTGACTT	GGACAAACCTG	ACTGGCTTTG	CACAGGTGTT	CCCTGAGTTG	2400
TTTGCAGGTT	TCTGTGTGTG	GGGTGGGTA	TGGGGAGGAG	AACCTTCATG	GTGGCCACC	2460	
TGGCCTGGTT	GTCCAAGCTG	TGCCTCGACA	CATCCTCATC	CCCAGCATGG	GACACCTCAA	2520	

GATGAATAAT AATTCAACAAA ATTTCTGTGA AATCAAATCC AGTTTAAGA GGAGCCACTT	2580
ATCAAAGAGA TTTAACAGT AGTAAGAAGG CAAAGAATAA ACATTTGATA TTCAGCAACT	2640
5 G	2641

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

10 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
 (A) LÄNGE: 199 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (D) TOPOLOGIE: linear

15 (ii) ART DES MOLEKÜELS: Protein

## 20 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys	
1 5 10 15	

25 Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile	
20 25 30	

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val	
35 40 45	

30 Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp	
50 55 60	

35 Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu	
65 70 75 80	

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu	
85 90 95	

40 Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser	
100 105 110	

45 Ile Phe Asp Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu	
115 120 125	

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro	
130 135 140	

50 Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu	
145 150 155 160	

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro	
165 170 175	

55 Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser	
180 185 190	

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu	
195	

60

## (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

5 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotide  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜELS: DNA  
(iii) HYPOTHETISCH: Ja  
(iv) ANTISENSE: NEIN

10 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:3:

MGNCTSACNG AYGTNAC 17

15 (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

20 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:  
(A) LÄNGE: 17 Basenpaare  
(B) ART: Nucleotide  
(C) STRANGFORM: Einzelstrang  
(D) TOPOLOGIE: linear  
(ii) ART DES MOLEKÜELS: DNA  
(iii) HYPOTHETISCH: Ja  
25 (iv) ANTISENSE: NEIN

30 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

MGNYTDACNG AYGTNAC 17

35

## Patentansprüche

1. Ein Polypeptid

5 a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,

b) das auf aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und

10 c) das ein Dimer ist, wobei das Polypeptid ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des Polypeptids ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

15 2. Ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen und mit einer Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

20 3. Das Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

25 4. Eine DNA-Sequenz, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder ein Fragment hiervon kodiert.

5. DNA-Sequenz kodierend ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

30 a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang

b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und

c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.

6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach

Anspruch 4 oder 5.

7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.

5

8. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des Polypeptids in der Wirtszelle.

10 9. Ein Antikörper, der das Polypeptid gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.

10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.

11. Monoklonaler Antikörper, der das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore Ionomycin aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper-sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

20 12. Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.

13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.

25 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.

30 16. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.

17. Verwendung des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

5 18. Verwendung von Zellen, enthaltend das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.

19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen 10 Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

20. Verwendung von Substanzen, die das Polypeptid nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.

15 21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure-(RNA, DNA)-Moleküle umfassen.

22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder 20 Nukleinsäureamplifikationstechnik (z.B. PCR) verwendet wird.

23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

25 24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmunassay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.

30 25. Verwendung von Substanzen, die den Signaltransduktionsweg des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) als Arzneimittel.

26. Verwendung von Substanzen, die die Heraufregulation des Polypeptids nach einem der Ansprüche 1-3 an die T-Zelloberfläche verhindern als Arzneimittel.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/DE 98/02896

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

IPC 6	C07K14/705	C12N15/12	C12N5/10	C07K16/28	C12N5/12
	G01N33/53	A61K38/17	C12Q1/68		

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N G01N A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LANIER L L ET AL: "CD80 (B7) AND CD86 (B70) PROVIDE SIMILAR COSTIMULATORY SIGNALS FOR T CELL PROLIFERATION, CYTOKINE PRODUCTION, AND GENERATION OF CTL" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 154, 1 January 1995, pages 97-105, XP002018932 see the whole document</p> <p>---</p>	1-12
A	<p>FREEMAN G J ET AL: "CLONING OF B-2: A CTLA-4 COUNTER-RECEPTOR THAT COSTIMULATES HUMAN T CELL PROLIFERATION" SCIENCE, vol. 262, 5 November 1993, pages 909-911, XP002069402 see the whole document</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-12

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 March 1999

Date of mailing of the international search report

23.03.99

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bilang, J

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Final Application No  
PCT/DE 98/02896

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 90 04180 A (T CELL SCIENCES INC) 19 April 1990 see page 74, line 13 ----	9-12
A	WO 89 10398 A (ELLCO FOOD AB) 2 November 1989 see page 11, line 34 - page 12, line 16 see page 15, line 11 - page 16, line 17 ----	9-12
P, X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human Cell Surface Protein" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER W75956, XP002094461 see the whole document & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3 September 1998 ----	1-3, 9-12, 16-19
P, X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human cell surface protein encoding cDNA" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER V53199, XP002094462 see the whole document & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3 September 1998 -----	4-8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/DE 98/02896

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  

Although Claims Nos. 13-19, 25 and 26 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition
2.  Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/DE 98/02896

Although Claims Nos. 13-19, 25 and 26 relate to a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

Although Claims Nos. 20-24 relate to a diagnostic method which is carried out on the human/animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/02896

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9004180	A 19-04-1990	AU 4416189	A	01-05-1990
		CA 2000308	A	06-04-1990
		WO 9208981	A	29-05-1992
		WO 9208980	A	29-05-1992
		US 5292636	A	08-03-1994
		US 5426029	A	20-06-1995
WO 8910398	A 02-11-1989	AT 107353	T	15-07-1994
		AU 3539289	A	24-11-1989
		DE 68916244	D	21-07-1994
		DE 68916244	T	09-02-1995
		EP 0413727	A	27-02-1991
		JP 3505156	T	14-11-1991
		US 5198357	A	30-03-1993

THIS PAGE BLANK (USPTO)

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02896

## A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C07K14/705 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/28 C12N5/12  
G01N33/53 A61K38/17 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N G01N A61K C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	LANIER L L ET AL: "CD80 (B7) AND CD86 (B70) PROVIDE SIMILAR COSTIMULATORY SIGNALS FOR T CELL PROLIFERATION, CYTOKINE PRODUCTION, AND GENERATION OF CTL" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd. 154, 1. Januar 1995, Seiten 97-105, XP002018932 siehe das ganze Dokument ---	1-12
A	FREEMAN G J ET AL: "CLONING OF B-2: A CTLA-4 COUNTER-RECEPTOR THAT COSTIMULATES HUMAN T CELL PROLIFERATION" SCIENCE, Bd. 262, 5. November 1993, Seiten 909-911, XP002069402 siehe das ganze Dokument ---	1-12 -/-



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung,

eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. März 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

23.03.99

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bilang, J

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/02896

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 90 04180 A (T CELL SCIENCES INC) 19. April 1990 siehe Seite 74, Zeile 13 ---	9-12
A	WO 89 10398 A (ELLCO FOOD AB) 2. November 1989 siehe Seite 11, Zeile 34 – Seite 12, Zeile 16 siehe Seite 15, Zeile 11 – Seite 16, Zeile 17 ---	9-12
P, X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human Cell Surface Protein" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER W75956, XP002094461 siehe das ganze Dokument & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3. September 1998 ---	1-3, 9-12, 16-19
P, X	TAMATANI T, TEZUKA K: "Human cell surface protein encoding cDNA" GENESEQ DATABASE, ACCESSION NUMBER V53199, XP002094462 siehe das ganze Dokument & WO 98 38216 A (JAPAN TOBACCO INC) 3. September 1998 -----	4-8

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 98/02896

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  
**Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.**
2.  Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>
	<p>Obwohl die Ansprüche 20-24 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

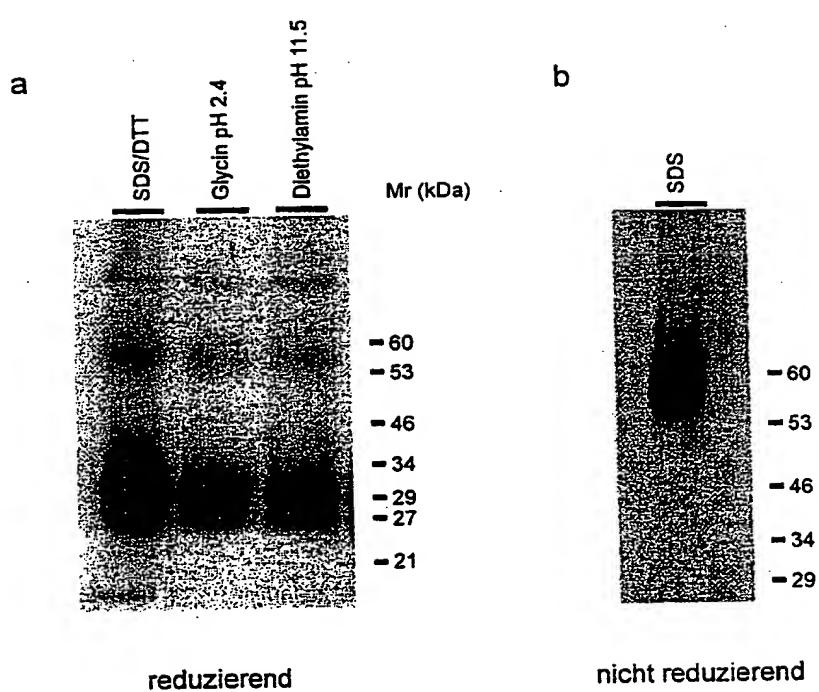
Intern:  als Aktenzeichen

PCT/DE 98/02896

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9004180	A 19-04-1990	AU	4416189 A	01-05-1990
		CA	2000308 A	06-04-1990
		WO	9208981 A	29-05-1992
		WO	9208980 A	29-05-1992
		US	5292636 A	08-03-1994
		US	5426029 A	20-06-1995
WO 8910398	A 02-11-1989	AT	107353 T	15-07-1994
		AU	3539289 A	24-11-1989
		DE	68916244 D	21-07-1994
		DE	68916244 T	09-02-1995
		EP	0413727 A	27-02-1991
		JP	3505156 T	14-11-1991
		US	5198357 A	30-03-1993

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/17

**FIG. 1**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

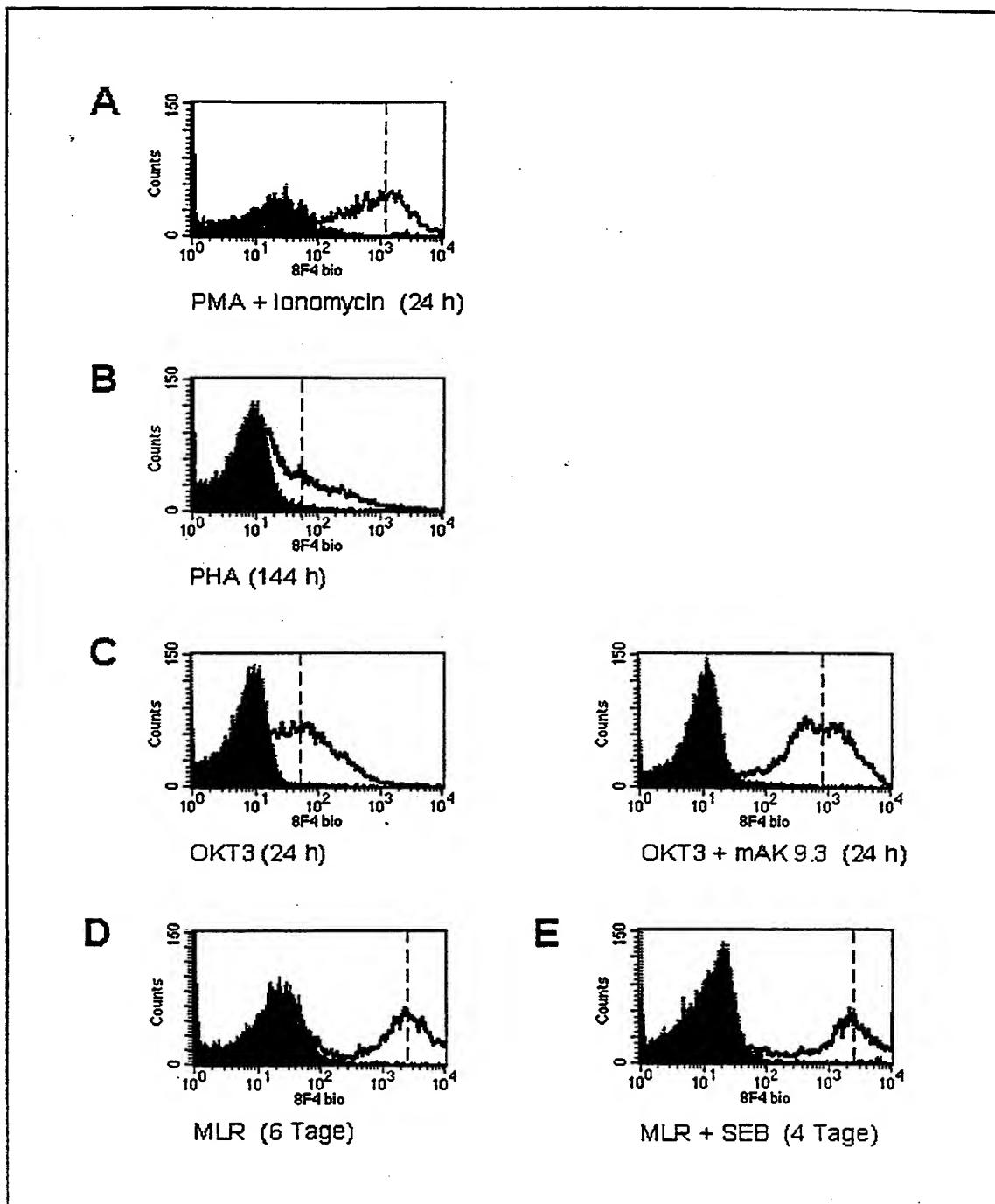
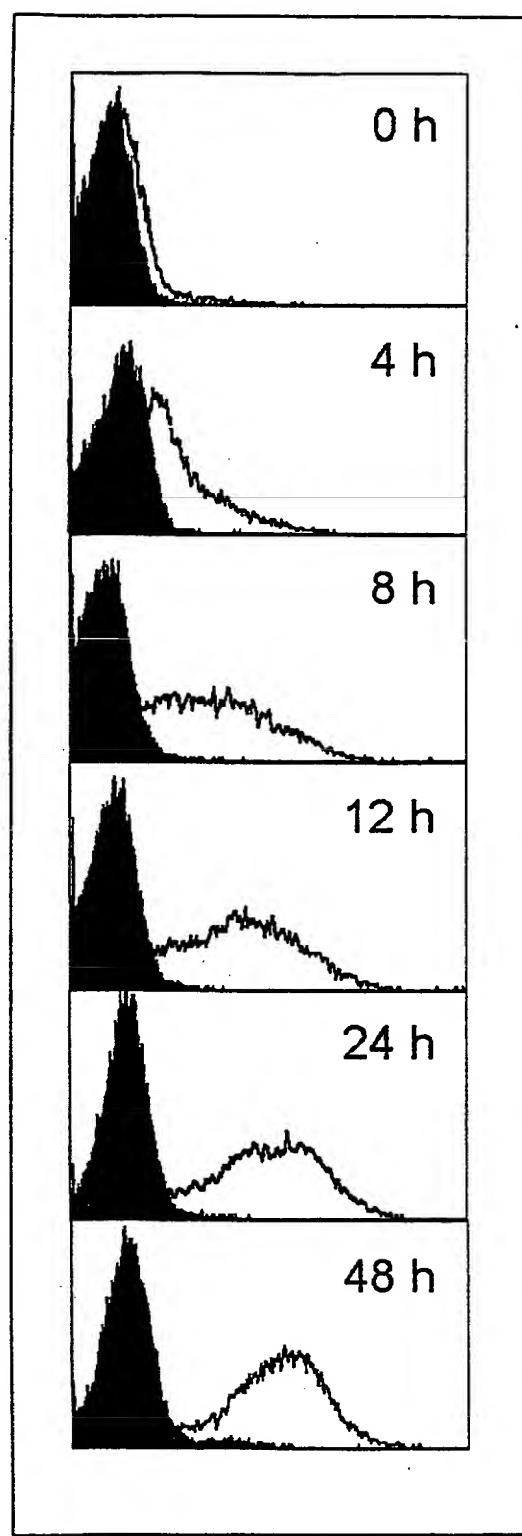
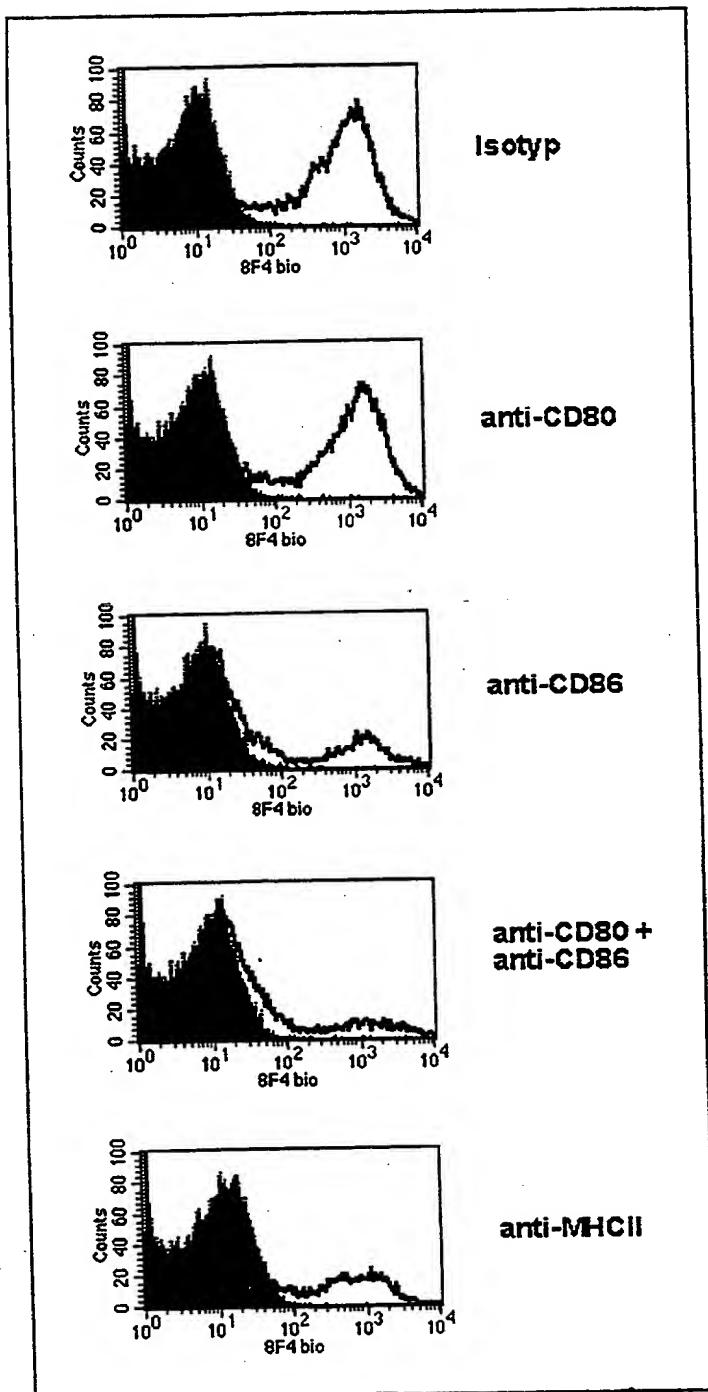


FIG. 2a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

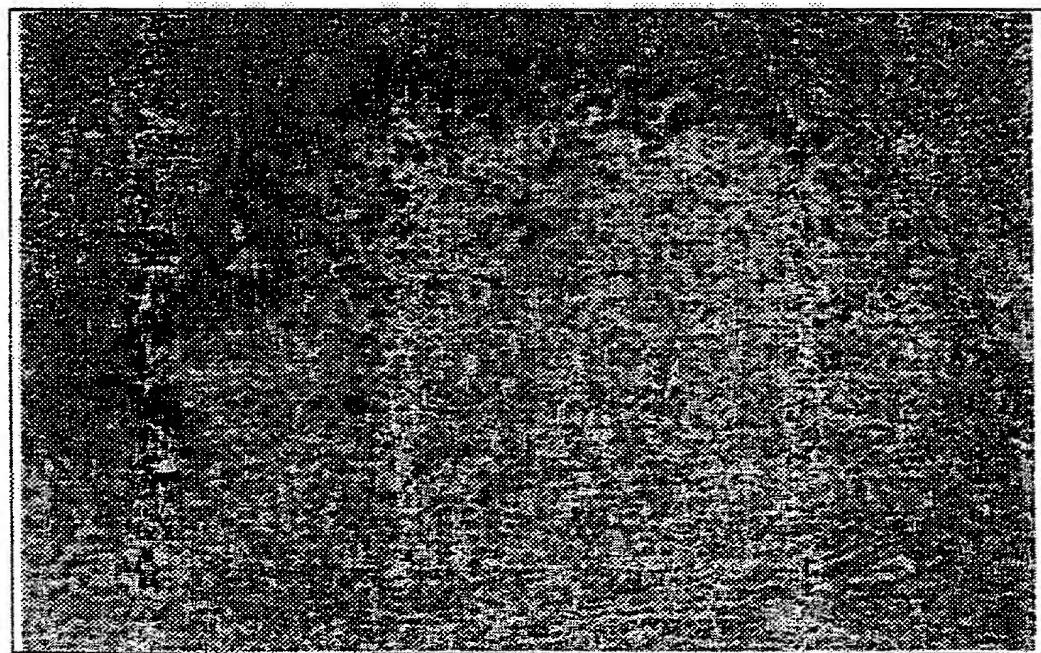
**FIG. 2b**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**FIG. 3**

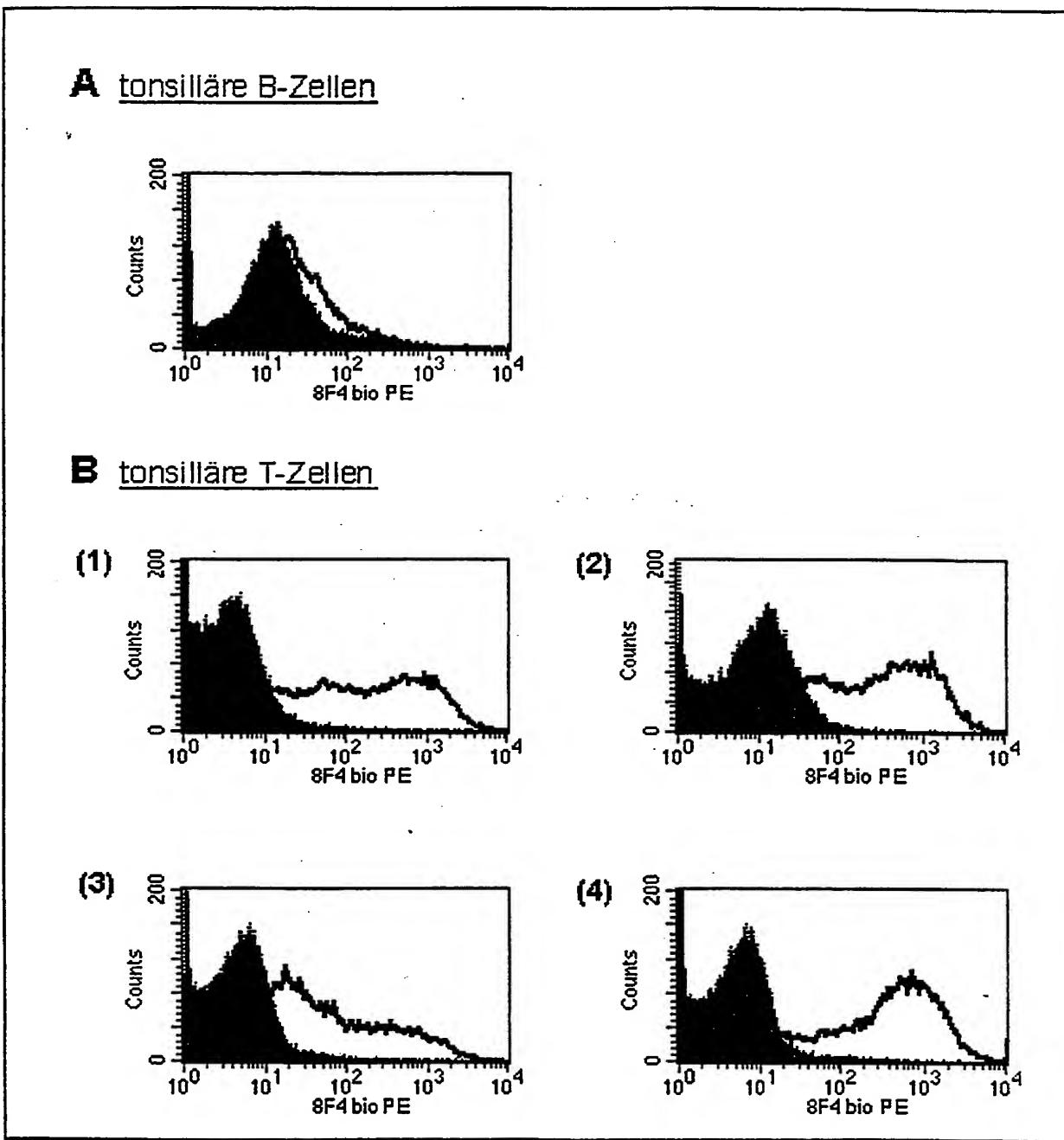
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5 / 17



**FIG. 4**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**FIG. 5**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

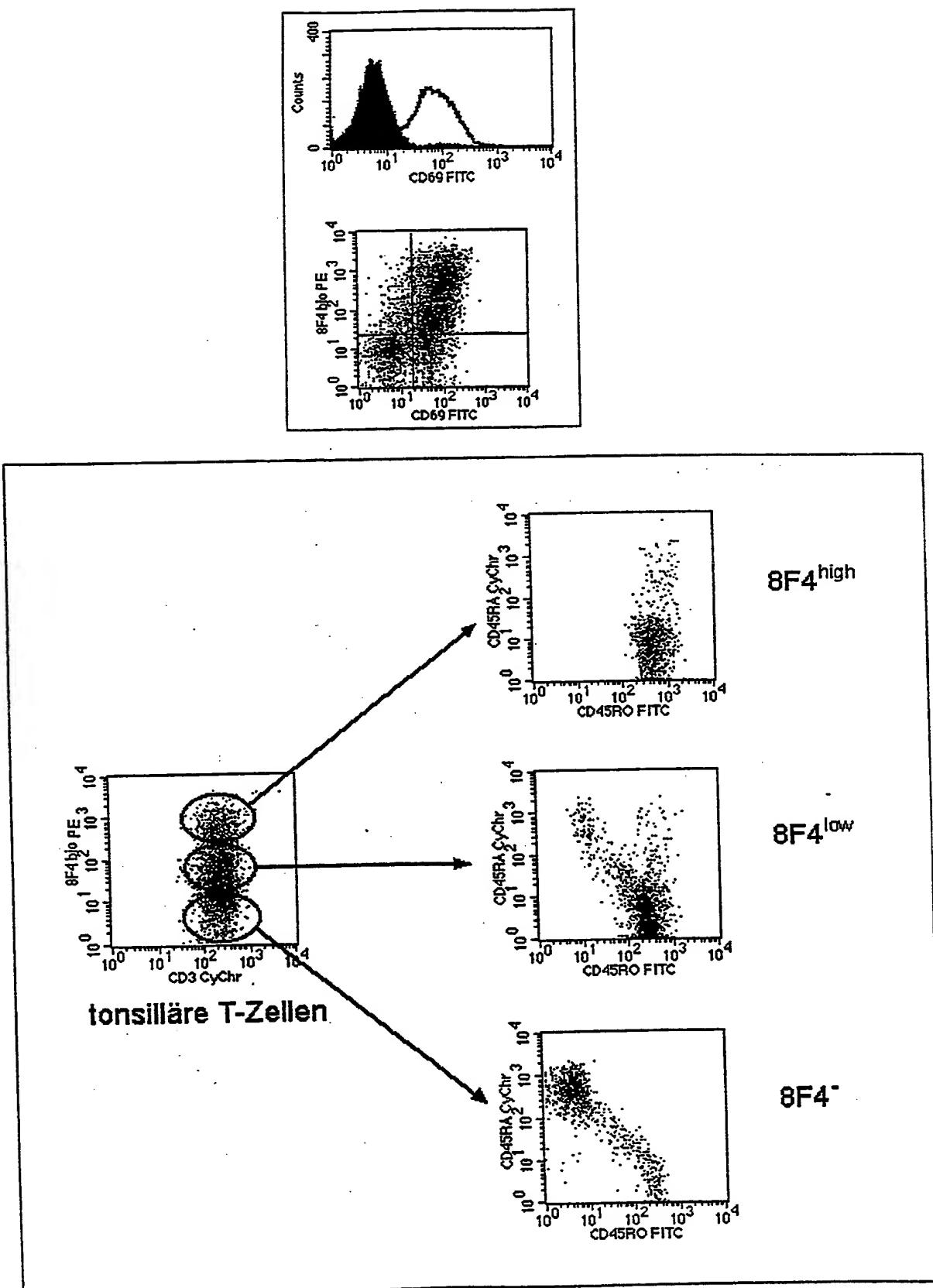


FIG. 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

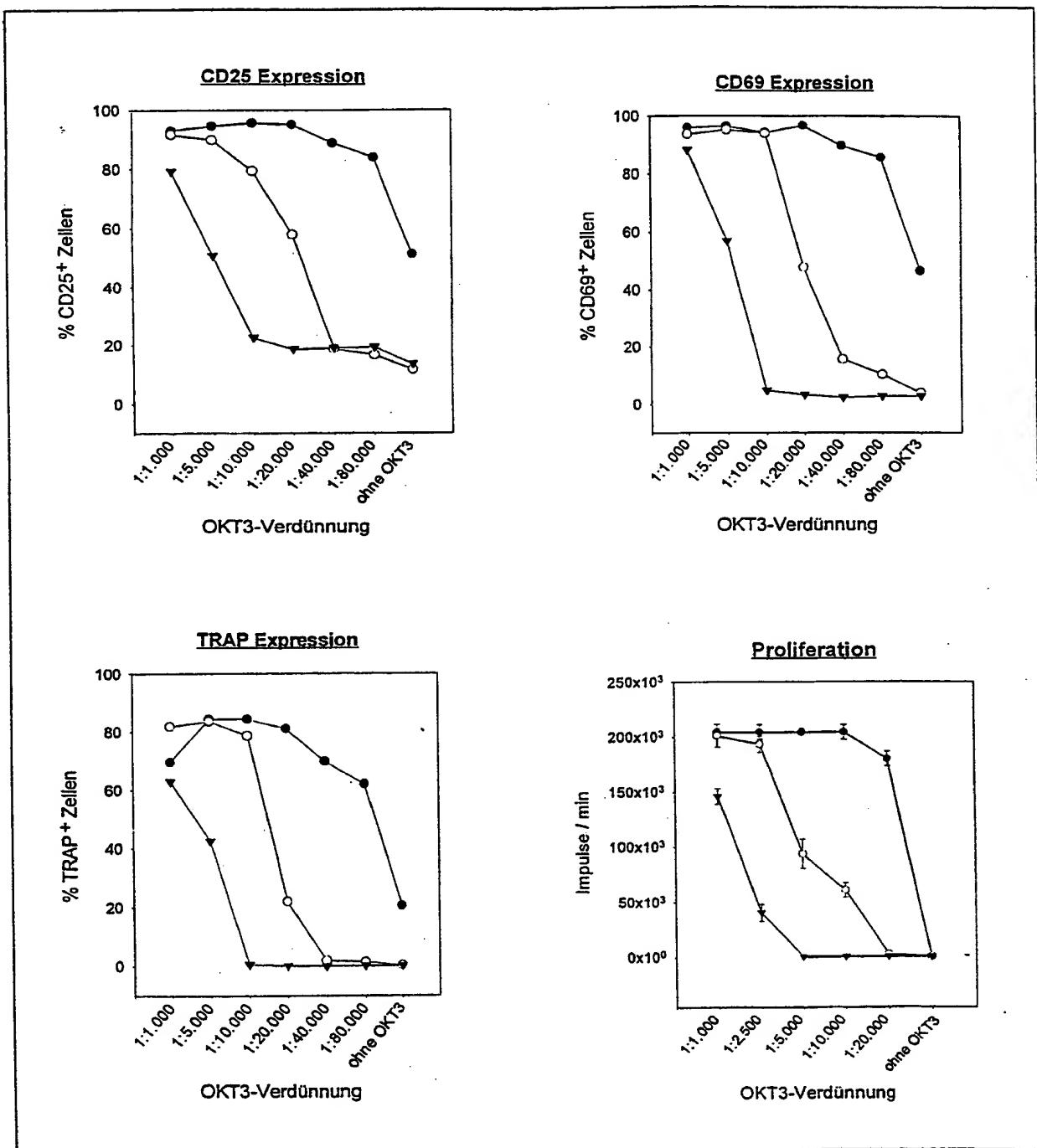


FIG. 7

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/17

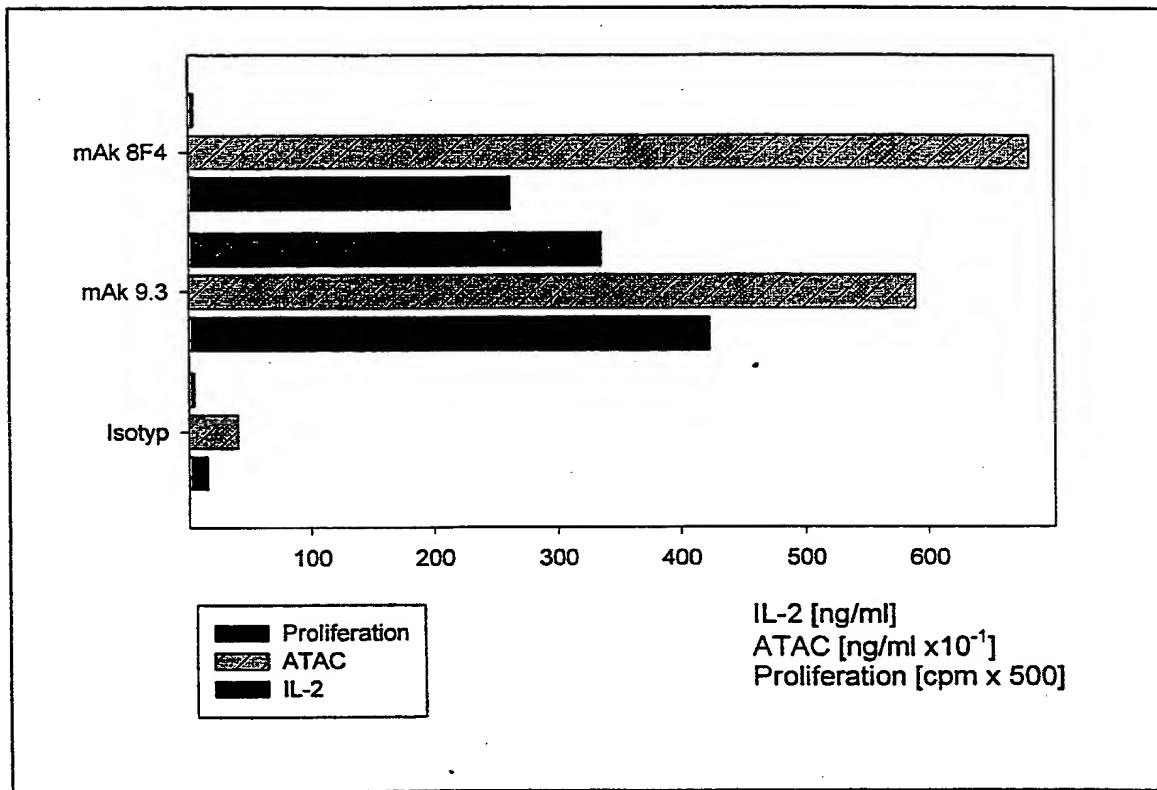
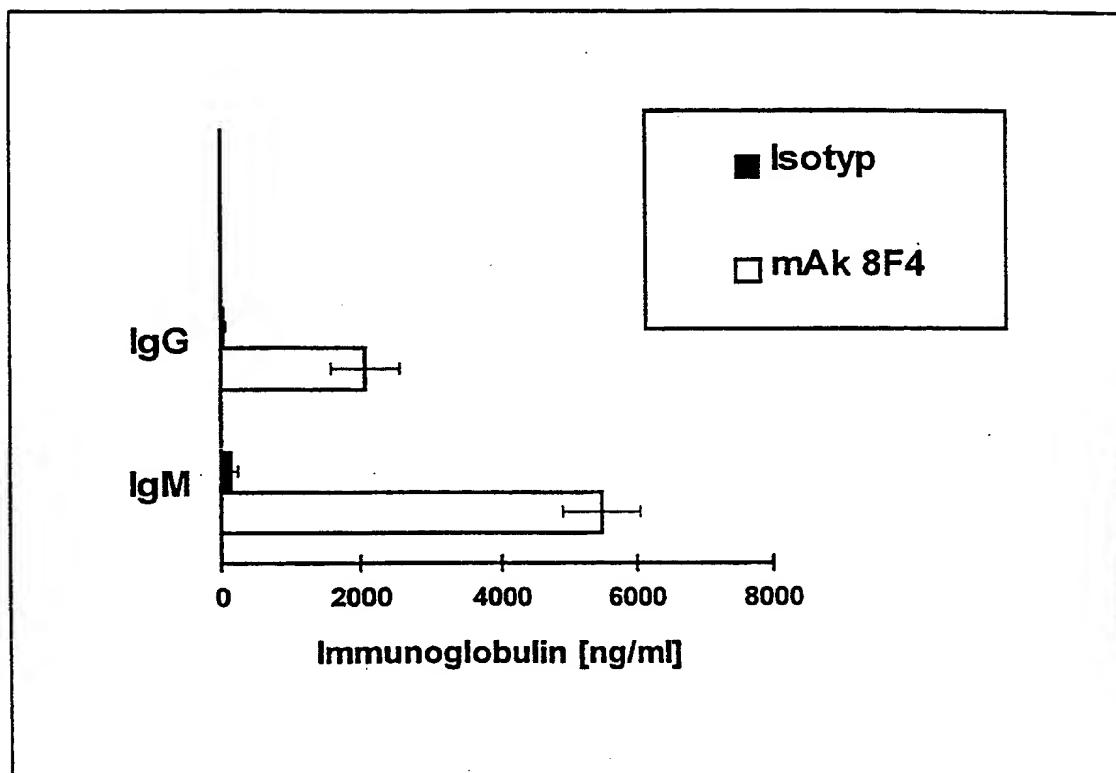


FIG. 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/17

**FIG. 9**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/17

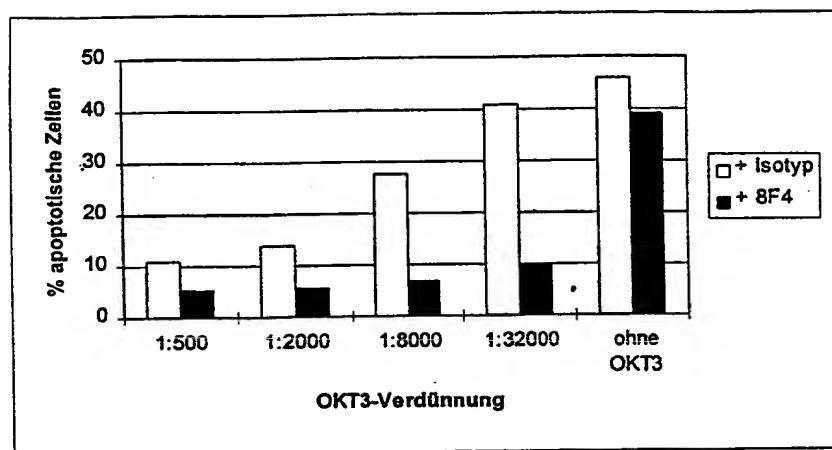
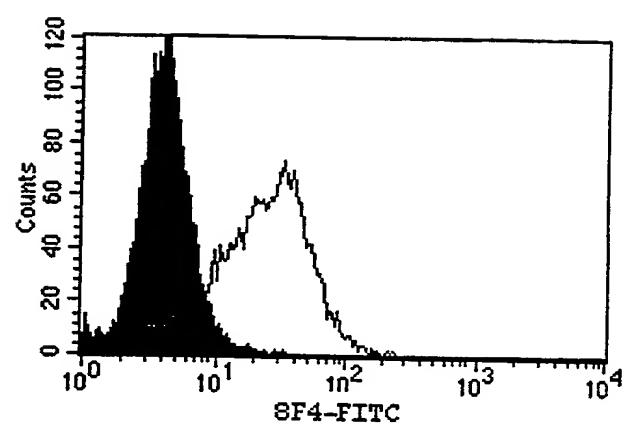


FIG. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO,

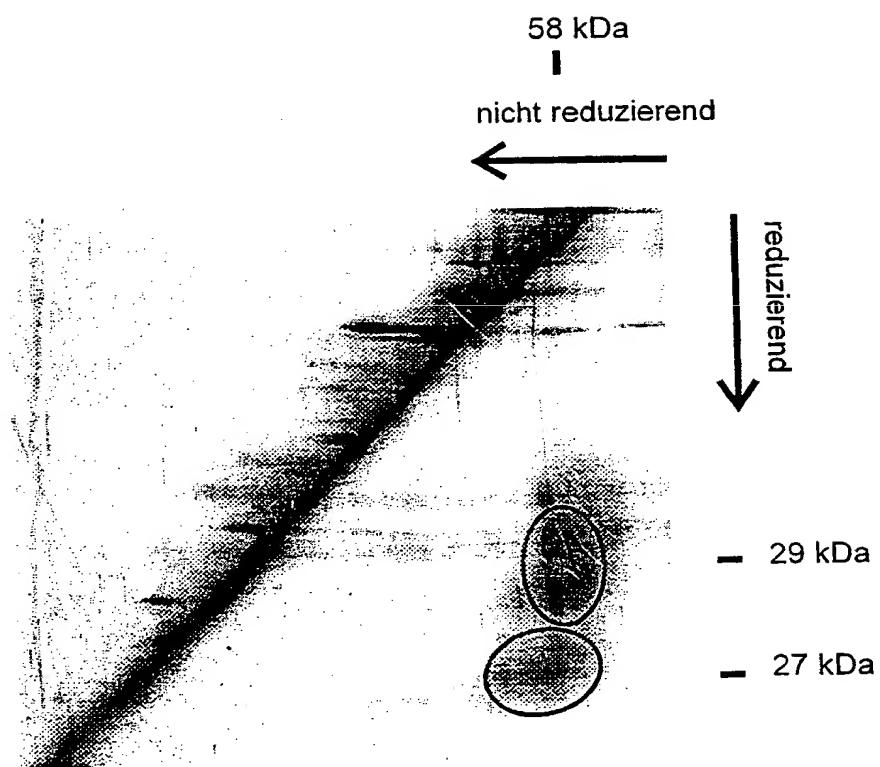
12/17



**FIG. 11**

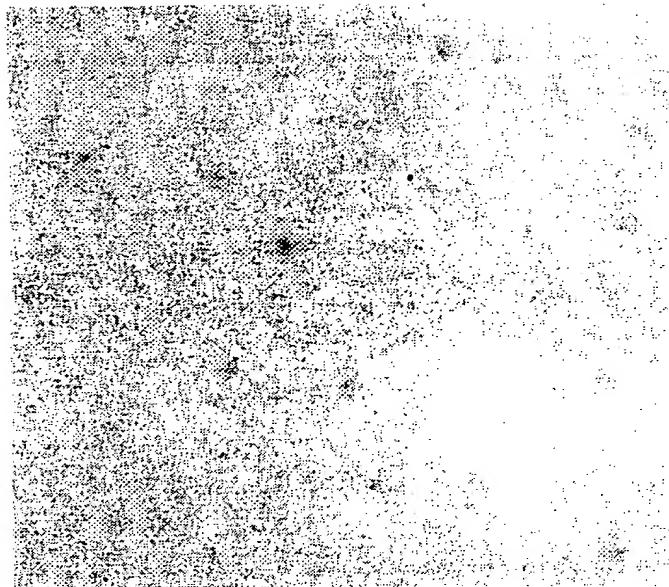
THIS PAGE BLANK ( verso )

13/17

**FIG. 12**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/17



**FIG. 13**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15/17

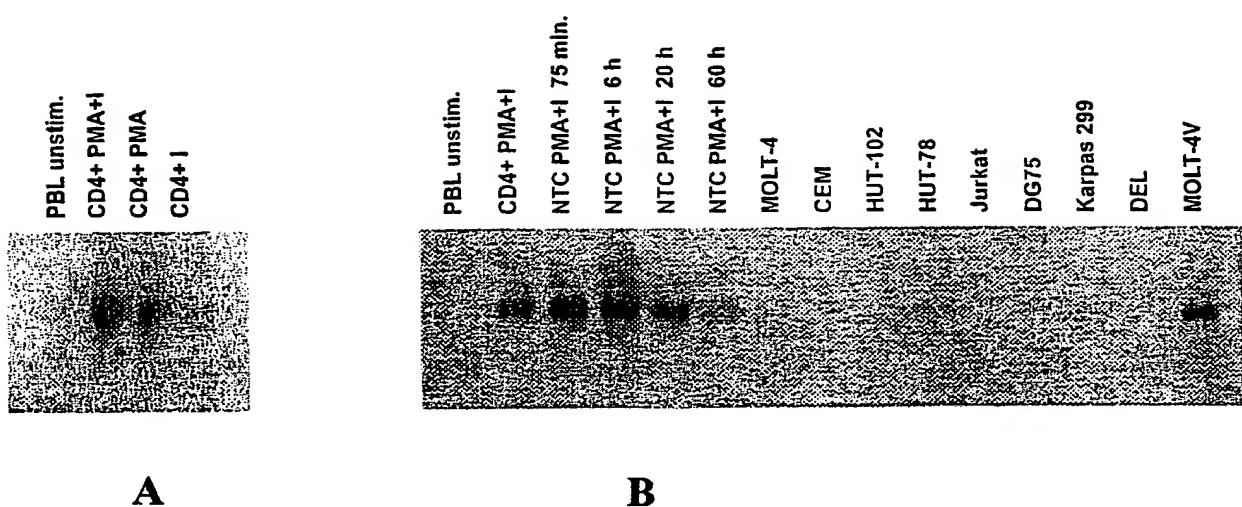


FIG. 14

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

16/17

MKSGLWYFFLFCRIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILCKYPDIVQQFKMQLL  
KGGQILCDLTKTGSGNTVSIKSLKFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYYFCNLSI  
FDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCQLKFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKKKYS  
SSVHDPNGEYMFMRNAVNTAKKSRLTDVTL

**FIG. 15**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

CGAGAGCCTGAATTCACTGTCAGCTTGAACACTGAACCGAGGACTGTTAAGTGTCT  
GGCAACATGAAGTCAGGCCTCTGGTATTCTTCTCTGCTTGCCTAAAGTTT  
AACAGGAGAAATCAATGGTCTGCCAATTATGAGATGTTATATTCACAACGGAGGTGT  
ACAAATTATGCAAATATCCTGACATTGTCAGCAATTAAAATGCAGTTGCTGAAAGG  
GGGGCAAATACTCTGCATCTCACTAAGACAAAAGGAAGTGGAAACACAGTGTCCATTAA  
GAGTCTGAAATTCTGCCATTCTCAGTTATCCAACAACAGTGTCTCTTTCTATACAA  
CTTGGACCATTCTCATGCCAATTACTCTGCAACCTATCAATTGATCCTCCTCC  
TTTAAAGTAACCTTACAGGAGGATATTGCATATTGAATCACAACATTGTTGCCA  
GCTGAAGTCTGGTTACCCATAGGATGTGCAGCCTTGTGAGTCTGCATTGGGATG  
CATACTTATTGTTGGCTACAAAAAAGAAGTATTCACTGACGACGACCTAACCG  
TGAATACATGTTCATGAGAGCAGTGAACACAGCAAAATCTAGACTCACAGATGTGAC  
CCTATAATATGAACTCTGGCACCCAGGCATGAAGCACGTTGCCAGTTCTCAACTT  
GAAGTGCAAGATTCTTATTCCGGGACCACGGAGAGTCTGACTTAACATACATCT  
TCTGCTGGTGTGTTCAATCTGGAAGAATGACTGTATCAGTCATGGGATTAAACA  
GAATGCCCTGGTACTGCCAGTCCTCTCAAAACAAACACCCCTTGCACACCAGCTTGG  
GAAAGCCAGCTCCTGTGTCACTGGGAGTGGAAATCCCTGTCTCCACATCTGCTCCTA  
GCAGTGCACTGCCAGTAAACAAACACATTACAAGAAAAATGTTAAAGATGCCAGG  
GGTACTGAATCTGCAAAGCAAATGAGCAGCCAAGGACCAGCATTGTCGCATTCACTA  
TCATACTACCTCTTCTGTAGGGATGAGAATTCTCTTTAATCAGTCAGGGAGAT  
GCTTCAAAGCTGGAGCTATTATTCTGAGATGTTGATGTAACGTACATTAGTACAT  
ACTCAGTACTCTCCTCAATTGCTGAACCCAGTTGACCAATTACCAAGACATTAGATG  
CTTCTTGTGCCCTCAATTCTTAAAGAATCTTCTACATGACTGCTTGACAGCCA  
ACAGCCACTCTCAATAGAGAGCTATGTCTACATTCTTCTGTGCTCAATAGTTT  
ATATATCTATGCATACATATACACACATATGTATATAAAATTCAATGAATATATT  
GCCTATATTCTCCCTACAAGAATATTGCTCCAGAAAGACATGTTCTTCTCAAATT  
CAGTTAAATGGTTACTTGTCAAGTTAGTGGTAGGAAACATTGCCCGAATTGAAAG  
CAAATTATTATTATCTTCTACATTCTGAGATGTTCTATGTTCTATGGTCTATTAAATT  
ACAAGTTAGTTCTTTGTAGATCATATTAAATGCAAACAAACATCTTAATGGG  
CCAGCATTCTCATGGGTAGAGCAGAAATATTCAATTAGCCTGAAAGCTGCAGTTACTATA  
GGTTGCTGTCAGACTATACCCATGGTGCCTCTGGGCTTGACAGGTCAAAATGGTCCCAT  
CAGCCTGGAGCAGCCCTCCAGACCTGGGTGGAAATTCCAGGGTTGAGAGACTCCCCTGAGC  
CAGAGGCCACTAGGTATTGCTCCCAGAGGCTGAAGTCACCCCTGGGAATCACAGTGGT  
CTACCTGCATTCTACATTCCAGGATCTGTGAAGAGACATATGTGTCAGGGACAATTCC  
CTCTCATAAAAACCACACAGCCTGAAATTGCCCTGGCCCTCAAGATAGCCTTCTTA  
GAATATGATTGGCTAGAAAGATTCTAAATATGTTGAATATGATTATTCTAGCTGGAA  
TATTCTACTTCTGTCTGCATGCCAAGGCTCTGAAGCAGCCAATGTCGATGCAA  
CAACATTGTAACCTTAGTAAACTGGGATTATGTTGAGTTAACATTGTAACGTG  
TGCTTATAGTTACAAGTGGAGACCCGATATGTCAATTGCATACTTATATTCTTAAGC  
ATGTGTAATGCTGGATGTTACAGTACAGTACTGAACCTGTAATTGAAATCTAGTATGGT  
GTTCTGTTTCAGCTGACTGGACAACCTGACTGGCTTGACAGGTGTTCCCTGAGTTG  
TTTGCAGGTTCTGTGTGGGTGGGTATGGGGAGGAGAACCTTCATGGTGGCCACC  
TGGCCTGGTGTCCAAGCTGTCCTCGACACATCCTCATCCCCAGCATGGGACACCTCAA  
GATGAATAATAATTCAACAAATTCTGTGAAATCAAATCCAGTTAACAGGAGGCCACTT  
ATCAAAGAGATTAAACAGTAGTAAGAAGGCAAAGAATAACATTGATATTGAGCAACT  
G

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference 169-2 PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE98/02896	International filing date (day/month/year) 23 September 1998 (23.09.1998)	Priority date (day/month/year) 23 September 1997 (23.09.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C07K 14/705		
Applicant BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN DIREKTOR DES ROBERT-KOCH-INSTITUTS		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 5 sheets, including this cover sheet.

This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 5 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I  Basis of the report
- II  Priority
- III  Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV  Lack of unity of invention
- V  Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI  Certain documents cited
- VII  Certain defects in the international application
- VIII  Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 21 April 1999 (21.04.1999)	Date of completion of this report 27 December 1999 (27.12.1999)
Name and mailing address of the IPEA/EP European Patent Office D-80298 Munich, Germany Facsimile No. 49-89-2399-4465	Authorized officer Telephone No. 49-89-2399-0

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

**PCT/DE98/02896****I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*):

the international application as originally filed.

the description, pages 1-25, as originally filed,

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the claims, Nos. \_\_\_\_\_, as originally filed,

Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,

Nos. 1-27, filed with the letter of 23 September 1999 (23.09.1999),

Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

the drawings, sheets/fig 1/17-17/17, as originally filed,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,

sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

the description, pages \_\_\_\_\_

the claims, Nos. \_\_\_\_\_

the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**See the Supplemental Box.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
PCT/DE 98/02896**I. Basis of the report**

1. This report has been drawn on the basis of (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.*)

Since the priority document is not available, the priority date for this international preliminary examination report is considered valid. Otherwise the international search report "P/X" type citations would be taken into consideration to assess the novelty and inventive step of the present invention.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/DE98/02896

**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.

claims Nos. 13-15, 20-23, 25, 26

because:

the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_ relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.

no international search report has been established for said claims Nos. 13-15, 20-23, 25, 26

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE 98/02896

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**

## 1. Statement

## 2. Citations and explanations

1. The present application describes a T cell surface protein with the biological activity of co-stimulation of T cells. The protein can be identified by an antibody 8F4 which was obtained by immunising mice with activated human T cells. The T cell surface protein is a dimer comprising two polypeptides of 27 and 29 kDa. Moreover, the application discloses the cDNA and the amino acid sequence of one of the two sub-units (29 kDa).
2. None of the available documents describes a polypeptide which has a homology of at least 40% with the sequence shown in SEQ ID NO:2.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VIII. Certain observations on the international application**

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

1. Claims 2 and 3 relate to analogues of the co-stimulating molecule. It is not clear what this means (other co-stimulating molecules can be regarded as functional analogues).
2. The International Preliminary Examining Authority states that the claimed co-stimulating molecule can only be produced with a considerable amount of effort and, consequently, there are particular doubts about subsequent processing.
  - 2.1 As per Claim 1 the molecule is characterised by its biological activity, its occurrence on activated T lymphocytes and by the molecular weight of its two sub-units. Since the antibodies 8F4 originally used are no longer available, a person skilled in the art has to carry out the complete method given in Example 1. Although it is possible, it is not certain whether a suitable antibody can be found.
  - 2.2 It is not clear whether antibodies which identify the dimer molecule can be produced based on the disclosed sequence for the 29 kDa sub-units. It is therefore also not clear whether the co-stimulating molecule can be separated in this way.
3. Antibodies and myeloma cells termed "8F4" are known in the literature (e.g. WO90 04180 and WO 89 10398). The 8F4 antibodies already disclosed and the antibodies described in the application do not

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**

International application No.

PCT/DE 98/02896

**VIII. Certain observations on the international application**

appear to be related.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

XP-00209446

P.D. 11-12-98  
P. ..... = (1)

ID W75956 standard; Protein: 199 AA.  
AC W75956;  
DT 11-DEC-1998 (first entry)  
DE Human cell surface protein #1.  
KW Human; cell surface protein; thymocyte; lymphocyte; cell adhesion;  
KW signal transmission; autoimmune disorder; allergy; diagnosis;  
KW mitogen-stimulated.  
OS Homo sapiens.  
PN W09838216-A1.  
PD 03-SEP-1998.  
PF 27-FEB-1998; J00837.  
PR 26-FEB-1998; JP-062217.  
PR 27-FEB-1997; JP-062290.  
PA (NISB ) JAPAN TOBACCO INC.  
PI Tamatani T, Tezuka K;  
DR WPI; 98-481144/41.  
DR N-PSDB; V53198.  
PT Cell surface molecule expressed in thymocytes and lymphocytes and -  
PT mediating signal transmission and cell adhesion, and antibodies to  
PT it useful in treatment of auto:immune and allergic disorders.  
PS Claim 2; Page 99-101; 149pp; Japanese.  
CC The present sequence represents a human cell surface protein which is  
CC expressed by thymocytes and by mitogen-stimulated lymphocytes. The cell  
CC surface protein induces adhesion of mitogen-stimulated lymphocytes to  
CC antibodies recognising the cell surface protein. These antibodies also  
CC produce an increase in peripheral blood lymphocytes in the presence of  
CC an antibody recognising CD3 antigen. The cell surface protein contains  
CC the amino acid sequence FDPPPF in its extracellular region and the  
CC sequence YMFM in its intracellular region. The cell surface protein can  
CC be used in the prevention and treatment of autoimmune and allergic  
CC diseases, and in the diagnosis and investigation of such disorders.  
SQ Sequence 199 AA;

W75956 Length: 199 February 22, 1999 16:02 Type: P Check: 629 ..

1 MKSGLWYFFL FCLRIKVLTG EINGSANYEM FIFHNGGVQI LCKYPDIVQQ  
51 FKMQLLKGGQ ILCDLTKTKG SGNTVSIKSL KFCHSQLSNN SVSFFLYNLD  
101 HSHANYYFCN LSIFDPPPFK VTLTGGYLHI YESQLCCQLK FWLPIGCAAF  
151 VVVCILGCIL ICWLTKKKYS SSVHDPNGEY MFMRAVNTAK KSRLTDVTL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

851 GCTTTGGAGA AAGCCCAGCT CCTGTGTGCT CACTGGGAGT GGAATCCCTG  
901 TCTCCACATC TGCTCCTAGC AGTGCATCAG CCAGTAAAAC AAACACATTT  
951 ACAAGAAAAA TGTTTAAAG ATGCCAGGGG TACTGAATCT GCAAAGCAAA  
1001 TGAGCAGCCA AGGACCAGCA TCTGTCCGCA TTTCACTATC ATACTACCTC  
  
1051 TTCTTTCTGT AGGGATGAGA ATTCCCTCTT TAATCAGTCA AGGGAGATGC  
1101 TTCAAAGCTG GAGCTATTCTT ATTTCTGAGA TGTTGATGTG AACTGTACAT  
1151 TAGTACATAC TCAGTACTCT CCTTCAATTG CTGAACCCCCA GTTGACCATT  
1201 TTACCAAGAC TTTAGATGCT TTCTGTGCC CTCAATTTC TTTTAAAAAA  
1251 TACTTCTACA TGACTGCTTG ACAGCCAAC AGCCACTCTC AATAGAGAGC  
1301 TATGTCTTAC ATTCTTCCT CTGCTGCTCA ATAGTTTAT ATATCTATGC  
1351 ATACATATAT ACACACATAT GTATATAAAA TTCATAATGA ATATATTGCG  
1401 CTATATTCTC CCTACAAGAA TATTTTGCT CCAGAAAGAC ATGTTCTTTT  
1451 CTCAAATTCA GTTAAAATGG TTTACTTTGT TCAAGTTAGT GGTAGGAAAC  
1501 ATTGCCCGGA ATTGAAAGCA AATTTAWWTT ATTATCCTAT TTTCTACCAT  
  
1551 TATCTATGTT TTCATGGTGC TATTAATTAC AAGTTTAGTT CTTTTGTAG  
1601 ATCATATTAA AATTGCAAAC AAAATCATCT TTAATGGGCC AGCATTCTCA  
1651 TGGGGTAGAG CAGAATATTC ATTTAGCCTG AAAGCTGCAG TTACTATAGG  
1701 TTGCTGTCAG ACTATACCCA TGGTGCCTCT GGGCTTGACA GGTCAAAATG  
1751 GTCCCCATCA GCCTGGAGCA GCCCTCCAGA CCTGGGTGGA ATTCCAGGGT  
1801 TGAGAGACTC CCCTGAGCCA GAGGCCACTA GGTATTCTTG CTCCCAGAGG  
1851 CTGAAGTCAC CCTGGGAATC ACAGTGGTCT ACCTGCATTC ATAATTCCAG  
1901 GATCTGTGAA GAGCACATAT GTGTCAGGGC ACAATTCCCT CTCATAAAAAA  
1951 CCACACAGCC TGGAAATTGG CCCTGGCCCT TCAAGATAGC CTTCTTTAGA  
2001 ATATGATTG GCTAGAAAGA TTCTTAAATA TGTGGAATAT GATTATTCTT  
  
2051 AGCTGGAATA TTTCTCTAC TTCCTGTCTG CATGCCAACG GCTTCTGAAG  
2101 CAGCCAATGT CGATGCAACA ACATTTGTA CTTTAGGTAA ACTGGGATTA  
2151 TGTTGTAGTT TAACATTTG TAACTGTGTG CTTATAGTTT ACAAGTGAGA  
2201 CCCGATATGT CATTATGCAT ACTTATATTA TCTTAAGCAT GTGTAATGCT  
2251 GGATGTGTAC AGTACAGTAC WTAACCTGTA ATTTGAATCT AGTATGGTGT  
2301 TCTGTTTCA GCTGACTTGG ACAACCTGAC TGGCTTTGCA CAGGTGTTCC  
2351 CTGAGTTGTT TGCAGGTTTC TGTGTGTGGG GTGGGGTATG GGGAGGAGAA  
2401 CCTTCATGGT GGCCCACCTG GCCTGGTTGT CCAAGCTGTG CCTCGACACAA  
2451 TCCTCATCCC AAGCATGGGA CACCTCAAGA TGAATAATAA TTCACAAAAT  
2501 TTCTGTGAAA TCAAATCCAG TTTAAGAGG AGCCACTTAT CAAAGAGATT  
  
2551 TTAACAGTAG TAAGAAGGCA AAGAATAAAC ATTTGATATT CAGCAACTGA  
2601 AAAAAAAA

XP-00209446

P.D. 11-12-1  
p. complete = 2

ID V53199 standard; cDNA; 2610 BP.  
AC V53199;  
DT 11-DEC-1998 (first entry)  
DE Human cell surface protein #2 encoding cDNA.  
KW Human; cell surface protein; thymocyte; lymphocyte; cell adhesion;  
KW signal transmission; autoimmune disorder; allergy; diagnosis;  
KW mitogen-stimulated; ss.  
OS Homo sapiens.  
FH Key Location/Qualifiers  
FT CDS 26. .625  
FT /\*tag= a  
FT /product= "cell surface protein"  
PN WO9838216-A1.  
PD 03-SEP-1998.  
PF 27-FEB-1998; J00837.  
PR 26-FEB-1998; JP-062217.  
PR 27-FEB-1997; JP-062290.  
PA (NISB ) JAPAN TOBACCO INC.  
PI Tamatani T, Tezuka K;  
DR WPI: 98-481144/41.  
DR P-PSDB; W75957.  
PT Cell surface molecule expressed in thymocytes and lymphocytes and -  
PT mediating signal transmission and cell adhesion, and antibodies to  
PT it useful in treatment of autoimmune and allergic disorders.  
PS Claim 9; Page 101-105; 149pp; Japanese.  
CC The present sequence encodes a human cell surface protein which is  
CC expressed by thymocytes and by mitogen-stimulated lymphocytes. The cell  
CC surface protein induces adhesion of mitogen-stimulated lymphocytes to  
CC antibodies recognising the cell surface protein. These antibodies also  
CC produce an increase in peripheral blood lymphocytes in the presence of  
CC an antibody recognising CD3 antigen. The cell surface protein contains  
CC the amino acid sequence FDPPPF in its extracellular region and the  
CC sequence YMFM in its intracellular region. The cell surface protein can  
CC be used in the prevention and treatment of autoimmune and allergic  
CC diseases, and in the diagnosis and investigation of such disorders.  
SQ Sequence 2610 BP; 743 A; 544 C; 505 G; 815 T;

V53199 Length: 2610 February 22, 1999 15:34 Type: N Check: 359 ..

1 GGAATCTTAA CTGTTCTGG CAAACATGAA GTCAGGCCTC TGGTATTCT  
  
51 TTCTCTTCTG CTTGCCATT AAAGTTTAA CAGGAGAAAT CAATGGTTCT  
101 GCCAATTATG AGATGTTAT ATTCACAAC GGAGGTGTAC AAATTTATG  
151 CAAATATCCT GACATTGTCC AGCAATTAA AATGCAGTTG CTGAAAGGGG  
201 GGCAAATACT CTGCGATCTC ACTAAGACAA AAGGAAGTGG AAACACAGTG  
251 TCCATTAAGA GTCTGAAATT CTGCCATTCT CAGTTATCCA ACAACAGTGT  
301 CTCTTTTTT CTATACAAC TGGACCATTG TCATGCCAAC TATTACTTCT  
351 GCAACCTATC AATTTTGAT CCTCCTCCTT TTAAAGTAAC TCTTACAGGA  
401 GGATATTTGC ATATTTATGA ATCACAACCT TGTTGCCAGC TGAAGTTCTG  
451 GTTACCCATA GGATGTGCAG CCTTGTGTTAGTCTGCATT TTGGGATGCA  
501 TACTTATTTG TTGGCTTACA AAAAGAAGT ATTCACTCCAG TGTGCACGAC  
  
551 CCTAACGGTG AATACATGTT CATGAGAGCA GTGAACACAG CCAAAAAATC  
601 TAGACTCACA GATGTGACCC TATAATATGG AACTCTGGCA CCCAGGCATG  
651 AAGCACGTTG GCCAGTTTC CTCAACTTGA AGTGCAAGAT TCTCTTATTT  
701 CCGGGACCAC GGAGAGTCTG ACTTAACAC ATACATCTTC TGCTGGTGT  
751 TTGTTCAATC TGGAAGAATG ACTGTATCAG TCAATGGGA TTTAACAGA  
801 CTGCCTTGGT ACTGCCGAGT CCTCTCAAAA CAAACACCCCT CTTGCAACCA

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark  
Office  
(Box PCT)  
Crystal Plaza 2  
Washington, DC 20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 09 June 1999 (09.06.99)	Applicant's or agent's file reference 169-2 PCT
International application No. PCT/DE98/02896	Priority date (day/month/year) 23 September 1997 (23.09.97)
International filing date (day/month/year) 23 September 1998 (23.09.98)	
Applicant KROCZEK, Richard	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

21 April 1999 (21.04.99)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Christelle Croci
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

P

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM  
GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

REC'D 05 JAN 2000

WIPO

PCT

**INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT**

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>169-2 PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE98/02896</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/09/1998</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>23/09/1997</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C07K14/705</b>		
Anmelder <b>BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LETZTVERTRETEREN ..et al.</b>		

<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.</p>	
<p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li> <li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li> <li>III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li> <li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li> <li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li> <li>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li> <li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li> <li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li> </ul>	

Datum der Einreichung des Antrags <b>21/04/1999</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>27.12.99</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   <b>Europäisches Patentamt</b> D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  <b>Bilang, J</b> Tel. Nr. +49 89 2399 8707



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/02896

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-27 eingegangen am 24/09/1999 mit Schreiben vom 23/09/1999

### Zeichnungen, Blätter:

1/17-17/17 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- Beschreibung, Seiten:
- Ansprüche, Nr.:
- Zeichnungen, Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- die gesamte internationale Anmeldung.
- Ansprüche Nr. 13-15,20-23,25,26.

Begründung:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/02896

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. 13-15,20-23,25,26 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche 1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche 1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche 1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche

### 2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Bemerkungen zu Punkt I**

Da das Prioritätsdokument nicht verfügbar ist, wurde das Prioritätsdatum für diesen Vorläufigen Internationalen Prüfungsbericht als gültig angenommen. Andernfalls wären die im Internationalen Recherchenbericht zitierten P/X-Dokumente für die Beurteilung der Neuheit und erfinderischen Tätigkeit der vorliegenden Erfindung in Betracht zu ziehen.

**Bemerkungen zu Punkt V**

1. Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein T-Zellen Oberflächenprotein mit der Biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Das Protein wird erkannt durch einen Antikörper 8F4, welcher seinerseits durch die Immunisation von Mäusen mit aktivierten menschlichen T-Zellen erhalten wurden. Das T-Zellen Oberflächenprotein ist ein Dimer bestehend aus zwei Polypeptiden von 27 und 29 kDa. Die Anmeldung offenbart ausserdem die cDNA und die Aminosäuresequenz einer der beiden Untereinheiten (29 kDa).
2. Keines der verfügbaren Dokumente beschreibt ein Polypeptid welches mindestens 40% Homologie mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz aufweist.

**Bemerkungen zu Punkt VIII**

1. Die Ansprüche 2 und 3 beziehen sich auf Analogons des ko-stimulierenden Moleküls. Es ist nicht klar, was darunter zu verstehen ist (andere ko-stimulierende Moleküle können als funktionelle Analogons betrachtet werden).
2. Die mit der Internationalen Vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde stellt fest, dass das Beanspruchte ko-stimulierende Molekül nur unter erheblichem Aufwand herzustellen ist und daher gewisse Zweifel an der Nacharbeitbarkeit bestehen.
  - 2.1 Gemäss Anspruch 1 ist das Molekül charakterisiert durch seine biologische Aktivität, sein Vorkommen auf aktivierten T-Lymphozyten, und durch die Molekulargewichte seiner zwei Untereinheiten. Da der ursprünglich verwendete Antikörper 8F4 nicht zur Verfügung steht, muss der Fachmann die gesammte in

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Beispiel 1 angegebene Methode durchführen. Obwohl dies möglich ist, ist nicht sicher ob ein geeignete Antikörper gefunden werden kann.

- 2.2 Es ist nicht klar, ob ausgehend von der offenbarten Sequenz für die 29 kDa Untereinheit Antikörper hergestellt werden können, die das dimere Molekül erkennen. Es ist daher auch nicht klar, ob das ko-stimulierende Molekül auf diesem Wege isoliert werden kann.
3. Antikörper und Myelomazellen mit der Bezeichnung "8F4" sind in der Literatur bekannt (z.B. WO90 04180 und WO 89 10398). Es scheit kein Zusammenhang zwischen den bereits bekannten 8F4-Antikörpern und den in der Anmeldung beschriebenen Antikörpern zu bestehen.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 24.09.99

- 1 -

Bundesrepublik Deutschland,...  
PCT/DE98/02896

23. September 1999  
V29698PC BÖ/EL/ek

5

Patentansprüche

EPO - Munich  
9

24. Sep. 1999

1. Ein ko-stimulierendes Molekül

10 a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,

15 b) das auf aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, aber nicht auf  
ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen  
oder dendritischen Zellen vorkommt, und

20 c) das zwei Polypeptidketten aufweist, wobei das genannte Molekül ein  
Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht  
reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese, und wobei die zwei  
Polypeptidketten des genannten Moleküls ein Molekulargewicht von etwa  
27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-  
Polyacrylamidgelelektrophorese.

25 2. Ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-  
Stimulation von T-Zellen enthaltend eine Aminosäuresequenz, die  
mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden  
Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives  
Fragment oder ein Analogon davon.

30 3. Ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-  
Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die  
Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch  
aktives Fragment oder ein Analogon davon.

GEÄNDERTES BLATT

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4. Eine DNA-Sequenz, die ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 oder ein Fragment hiervon kodiert.
5. 5. Eine DNA-Sequenz kodierend ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
  - 10 b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
  - c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.
- 15 6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 4 oder 5.
7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.
- 20 8. Verfahren zur Herstellung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des genannten Moleküls in der Wirtszelle.
9. Ein Antikörper, der ein ko-stimulierendes Molekül gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.
- 25 10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.
11. Ein monoklonaler Antikörper, der ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophore Ionomycin

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11.24.09.99

- 3 -

aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

5

12. Eine Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.
  
- 10 13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.
  
- 15 14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
  
- 15 15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.
  
- 25 16. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.
  
17. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

GEÄNDERTES BLATT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

18. Verwendung von Zellen, enthaltend ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.
19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
20. Verwendung von Substanzen, die ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure- (RNA, DNA)- Moleküle umfassen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder Nukleinsäureamplifikationstechnik (z.B. PCR) verwendet wird.
23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmun-assay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.
25. Verwendung von Substanzen, die den Signaltransduktionsweg eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) als Arzneimittel.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 24.09.99

- 5 -

26. Verwendung von Substanzen, die die Heraufregulation eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 an die T-Zelloberfläche verhindern als Arzneimittel.
- 5 27. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Antikörpern.

GEÄNDERTES BLATT

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

BÖSL, Raphael  
Bardehle & Partner  
Galileiplatz 1  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Date of mailing (day/month/year) 19 October 1999 (19.10.99)
Applicant's or agent's file reference 169-2 PCT
International application No. PCT/DE98/02896

IMPORTANT NOTIFICATION  
International filing date (day/month/year)  
23 September 1998 (23.09.98)

1. The following indications appeared on record concerning: <input type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input checked="" type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative				
Name and Address  VOSSIUS, Volker Holbeinstraße 5 D-81679 München Germany	State of Nationality		State of Residence	
	Telephone No. 089 99 84 79-6			
	Facsimile No. 089 99 84 79 79			
	Teleprinter No.			
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the person <input checked="" type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence				
Name and Address  BÖSL, Raphael Bardehle & Partner Galileiplatz 1 D-81679 München Germany	State of Nationality		State of Residence	
	Telephone No.			
	Facsimile No.			
	Teleprinter No.			
3. Further observations, if necessary:				
4. A copy of this notification has been sent to:				
<input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority	<input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> other:			

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer  Céline Faust  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen: wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

## Regionales Patent

- AP ARIPO-Patent: GH Ghana. GM Gambia. KE Kenia. LS Lesotho. MW Malawi. SD Sudan. SZ Swasiland. UG Uganda. ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- EA Eurasisches Patent: AM Armenien. AZ Aserbaidschan. BY Belarus. KG Kirgisistan. KZ Kasachstan. MD Republik Moldau. RU Russische Föderation. TJ Tadschikistan. TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- EP Europäisches Patent: AT Österreich. BE Belgien. CH und LI Schweiz und Liechtenstein. DE Deutschland. DK Dänemark. ES Spanien. FI Finnland. FR Frankreich. GB Vereinigtes Königreich. GR Griechenland. IE Irland. IT Italien. LU Luxemburg. MC Monaco. NL Niederlande. PT Portugal. SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- OA OAPI-Patent: BF Burkina Faso. BJ Benin. CF Zentralafrikanische Republik. CG Kongo. CI Côte d'Ivoire. CM Kamerun. GA Gabun. GN Guinea. ML Mali. MR Mauretanien. NE Niger. SN Senegal. TD Tschad. TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

<input checked="" type="checkbox"/> AL Albanien .....	<input checked="" type="checkbox"/> LT Litauen
<input checked="" type="checkbox"/> AM Armenien .....	<input checked="" type="checkbox"/> LU Luxemburg
<input checked="" type="checkbox"/> AT Österreich .....	<input checked="" type="checkbox"/> LV Lettland
<input checked="" type="checkbox"/> AU Australien .....	<input checked="" type="checkbox"/> MD Republik Moldau .....
<input checked="" type="checkbox"/> AZ Aserbaidschan .....	<input checked="" type="checkbox"/> MG Madagaskar .....
<input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina .....	<input checked="" type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien .....
<input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados .....	<input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolci .....
<input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgarien .....	<input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi .....
<input checked="" type="checkbox"/> BR Brasilien .....	<input checked="" type="checkbox"/> MX Mexiko .....
<input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus .....	<input checked="" type="checkbox"/> NO Norwegen .....
<input checked="" type="checkbox"/> CA Kanada .....	<input checked="" type="checkbox"/> NZ Neuseeland .....
<input checked="" type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein .....	<input checked="" type="checkbox"/> PL Polen .....
<input checked="" type="checkbox"/> CN China .....	<input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal .....
<input checked="" type="checkbox"/> CU Kuba .....	<input checked="" type="checkbox"/> RO Rumänien .....
<input checked="" type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik .....	<input checked="" type="checkbox"/> RU Russische Föderation .....
<input type="checkbox"/> DE Deutschland .....	<input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan .....
<input checked="" type="checkbox"/> DK Dänemark .....	<input checked="" type="checkbox"/> SE Schweden .....
<input checked="" type="checkbox"/> EE Estland .....	<input checked="" type="checkbox"/> SG Singapur .....
<input checked="" type="checkbox"/> ES Spanien .....	<input checked="" type="checkbox"/> SI Slowenien .....
<input checked="" type="checkbox"/> FI Finnland .....	<input checked="" type="checkbox"/> SK Slowakei .....
<input checked="" type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich .....	<input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone .....
<input checked="" type="checkbox"/> GE Georgien .....	<input checked="" type="checkbox"/> TJ Tadschikistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana .....	<input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia .....	<input checked="" type="checkbox"/> TR Türkei .....
<input checked="" type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau .....	<input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago .....
<input checked="" type="checkbox"/> HU Ungarn .....	<input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine .....
<input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesien .....	<input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda .....
<input checked="" type="checkbox"/> IL Israel .....	<input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika .....
<input checked="" type="checkbox"/> IS Island .....	<input checked="" type="checkbox"/> UZ Usbekistan .....
<input checked="" type="checkbox"/> JP Japan .....	<input checked="" type="checkbox"/> VN Vietnam .....
<input checked="" type="checkbox"/> KE Kenia .....	<input checked="" type="checkbox"/> YU Jugoslawien .....
<input checked="" type="checkbox"/> KG Kirgisistan .....	<input checked="" type="checkbox"/> ZW Simbabwe .....
<input checked="" type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea .....	
<input checked="" type="checkbox"/> KR Republik Korea .....	
<input checked="" type="checkbox"/> KZ Kasachstan .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia .....	
<input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho .....	

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind

- CR Kroatien .....
- GD Grenada .....

.....

Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der Bestimmung von

Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird. und die Fristen für die Bestimmung und das Bestätigungsschreit. Die Bestimmung muß beim Anmelder innerhalb der Frist von 15 Monaten eintreten.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH

Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. 

Die Priorität der folgenden früheren Anmeldung(en) wird hiermit beansprucht:

Staat (Anmelde- oder Bestimmungsstaat der Anmeldung)	Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr)	Aktenzeichen	Anmeldeamt (nur bei regionaler oder internationaler Anmeldung)
(1) Deutschland (DE)	23. September 1997 (23.09.97)	197 41 929.1	
(2) Deutschland (DE)	11. Mai 1998 (11.05.98)	198 21 060.4	
(3)			

Dieses Kästchen ankreuzen, wenn die beglaubigte Kopie der früheren Anmeldung von dem Amt ausgestellt werden soll, das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist (eine Gebühr kann verlangt werden):

Das Anmeldeamt wird hiermit ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in Zeile(n) (1) + (2) bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem Internationalen Büro zu übermitteln.

## Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

Wahl der Internationalen Recherchenbehörde (ISA) (Sind zwei oder mehr Internationale Recherchenbehörden für die internationale Recherche zuständig, ist der Name der Behörde anzugeben, die die internationale Recherche durchführen soll; Zweibuchstaben-Code genügt):

ISA / EP

Frühere Recherche: Auszufüllen, wenn eine Recherche (internationale Recherche, Recherche internationaler Art oder sonstige Recherche) bereits bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist und diese Behörde nun ersucht wird, die internationale Recherche sowie wie möglich auf die Ergebnisse einer solchen früheren Recherche zu stützen. Die Recherche oder der Recherchenantrag ist durch Angabe der betreffenden Anmeldung (bzw. deren Übersetzung) oder des Recherchenantrags zu bezeichnen.

Staat (oder regionales Amt):

Datum (Tag/Monat/Jahr) :

Aktenzeichen:

## Feld Nr. VIII KONTROLLISTE

Diese internationale Anmeldung umfasst:

1. Antrag : 3 Blätter  
2. Beschreibung : 25 Blätter  
3. Ansprüche : 3 Blätter  
4. Zusammenfassung : 1 Blätter  
5. Zeichnungen : 17 Blätter  
Insgesamt : 49 Blätter

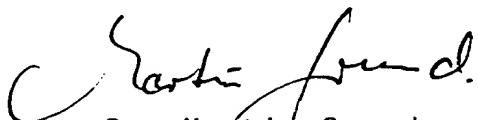
Dieser internationale Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

1.  Unterzeichnete gesonderte 5.  Blatt für die Gebührenberechnung  
Vollmacht folgt  
2.  Kopie der allgemeinen 6.  Gesonderte Angaben zu hinter-  
Vollmacht legten Mikroorganismen  
3.  Begründung für das Fehlen 7.  Sequenzprotokolle für Nucleotide  
der Unterschrift und/oder Aminosäuren (Diskette)  
4.  Prioritätsbeleg(e) (durch 8.  Sonstige (einzelnen aufführen):  
die Zeilennummer von Feld Nr. VI kennzeichnen):  
Scheck Nr. 303559086

Abbildung Nr. 14 der Zeichnungen (falls vorhanden) soll mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden.

## Feld Nr. IX UNTERSCHRIFFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.



Dr. Martin Grund  
Patentanwalt

DR. VOLKER VOSSIUS  
PATENT- UND RECHTSANWALTSKANZIE  
HOLBEINSTR. 5  
81679 MÜNCHEN

Vom Anmeldeamt auszufüllen

1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:

526 Rec'd PCT/PTO 22 MAR 2000

3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:

4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:

5. Vom Anmelder benannte Internationale Recherchenbehörde:

ISA /

2. Zeichnungen  
einge-  
gangen: nicht ein-  
gegangen:6.  Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchengebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Datum des Eingangs des Aktenexemplars  
beim Internationalen Büro:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

Bösl, Raphael, Dr  
BARDEHLE&PARTNER  
Galileiplatz 1  
D-81679 München  
ALLEMAGNE

Patent- u. Rechtsanwalt  
Galileiplatz 1, München

29. Dez. 1999

Frist  
Seal

PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG  
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN  
PRÜFUNGSBERICHTS  
(Regel 71.1 PCT)

Absendeadatum  
(Tag/Monat/Jahr)

27. 12. 99

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

169-2 PCT

V29698PC

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE98/02896

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)  
23/09/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)  
23/09/1997

Anmelder

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LETZTVERTRETEN ..et al.

- Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
- Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
- Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.

#### 4. ERINNERUNG

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung  
beauftragten Behörde  
Europäisches Patentamt

Bevollmächtigter Bediensteter  
Zoglauer, H



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>169-2 PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE98/02896</b>	Internationales Anmelde datum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/09/1998</b>	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) <b>23/09/1997</b>
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK <b>C07K14/705</b>		
Anmelder <b>BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LETZTVERTRETEREN ..et al.</b>		
<p>1. Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.</p> <p>2. Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).</p> <p>Diese Anlagen umfassen insgesamt 5 Blätter.</p> <p>3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>I <input checked="" type="checkbox"/> Grundlage des Berichts</li><li>II <input type="checkbox"/> Priorität</li><li>III <input checked="" type="checkbox"/> Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit</li><li>IV <input type="checkbox"/> Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung</li><li>V <input checked="" type="checkbox"/> Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erforderliche Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung</li><li>VI <input type="checkbox"/> Bestimmte angeführte Unterlagen</li><li>VII <input type="checkbox"/> Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung</li><li>VIII <input checked="" type="checkbox"/> Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung</li></ul>		

Datum der Einreichung des Antrags <b>21/04/1999</b>	Datum der Fertigstellung dieses Berichts <b>27.12.99</b>
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-8029 München	Bevollmächtigter Bediensteter  Bilanc



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/02896

## I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigefügt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

### Beschreibung, Seiten:

1-25 ursprüngliche Fassung

### Patentansprüche, Nr.:

1-27 eingegangen am 24/09/1999 mit Schreiben vom 23/09/1999

### Zeichnungen, Blätter:

1/17-17/17 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

Beschreibung, Seiten:  
 Ansprüche, Nr.:  
 Zeichnungen, Blatt:

3.  Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

siehe Beiblatt

## III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erforderliche Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erforderlicher Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

die gesamte internationale Anmeldung.  
 Ansprüche Nr. 13-15,20-23.25.26.

Begründung:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/02896

- Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- Für die obengenannten Ansprüche Nr. 13-15,20-23,25,26 wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

## V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

### 1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche	
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche	
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-12,16-19,24,27
	Nein: Ansprüche	

### 2. Unterlagen und Erklärungen

**siehe Beiblatt**

## VIII. Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Zur Klarheit der Patentansprüche, der Beschreibung und der Zeichnungen oder zu der Frage, ob die Ansprüche in vollem Umfang durch die Beschreibung gestützt werden, ist folgendes zu bemerken:

**siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Bemerkungen zu Punkt I**

Da das Prioritätsdokument nicht verfügbar ist, wurde das Prioritätsdatum für diesen Vorläufigen Internationalen Prüfungsbericht als gültig angenommen. Andernfalls wären die im Internationalen Recherchenbericht zitierten P/X-Dokumente für die Beurteilung der Neuheit und erfinderischen Tätigkeit der vorliegenden Erfindung in Betracht zu ziehen.

**Bemerkungen zu Punkt V**

1. Die vorliegende Anmeldung beschreibt ein T-Zellen Oberflächenprotein mit der Biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen. Das Protein wird erkannt durch einen Antikörper 8F4, welcher seinerseits durch die Immunisation von Mäusen mit aktivierten menschlichen T-Zellen erhalten wurden. Das T-Zellen Oberflächenprotein ist ein Dimer bestehend aus zwei Polypeptiden von 27 und 29 kDa. Die Anmeldung offenbart ausserdem die cDNA und die Aminosäuresequenz einer der beiden Untereinheiten (29 kDa).
2. Keines der verfügbaren Dokumente beschreibt ein Polypeptid welches mindestens 40% Homologie mit der in SEQ ID NO:2 gezeigten Sequenz aufweist.

**Bemerkungen zu Punkt VIII**

1. Die Ansprüche 2 und 3 beziehen sich auf Analogons des ko-stimulierenden Moleküls. Es ist nicht klar, was darunter zu verstehen ist (andere ko-stimulierende Moleküle können als funktionelle Analogons betrachtet werden).
2. Die mit der Internationalen Vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde stellt fest, dass das Beanspruchte ko-stimulierende Molekül nur unter erheblichem Aufwand herzustellen ist und daher gewisse Zweifel an der Nacharbeitbarkeit bestehen.

2.1 Gemäss Anspruch 1 ist das Molekül charakterisiert durch seine biologische Aktivität, sein Vorkommen auf aktivierten T-Lymphozyten, und durch die Molekulargewichte seiner zwei Untereinheiten. Da der ursprünglich verwendete Antikörper 8F4 nicht zur Verfügung steht, muss der Fachmann die gesammte in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Beispiel 1 angegebene Methode durchführen. Obwohl dies möglich ist, ist nicht sicher ob ein geeignete Antikörper gefunden werden kann.

- 2.2 Es ist nicht klar, ob ausgehend von der offenbarten Sequenz für die 29 kDa Untereinheit Antikörper hergestellt werden können, die das dimere Molekül erkennen. Es ist daher auch nicht klar, ob das ko-stimulierende Molekül auf diesem Wege isoliert werden kann.
3. Antikörper und Myelomazellen mit der Bezeichnung "8F4" sind in der Literatur bekannt (z.B. WO90 04180 und WO 89 10398). Es scheit kein Zusammenhang zwischen den bereits bekannten 8F4-Antikörpern und den in der Anmeldung beschriebenen Antikörpern zu bestehen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

124-08-99

- 1 -

Bundesrepublik Deutschland,...  
PCT/DE98/02896

23. September 1999  
V29698PC BÖ/EL/ek

5

Patentansprüche

EPO - Munich  
9

24. Sep. 1999

1. Ein ko-stimulierendes Molekül

10 a) mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen,

15 b) das auf aktivierten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, aber nicht auf ruhenden oder aktivierten B-Zellen, Granulozyten, Monozyten, NK-Zellen oder dendritischen Zellen vorkommt, und

20 c) das zwei Polypeptidketten aufweist, wobei das genannte Molekül ein Molekulargewicht von etwa 55 bis 60 kDa hat, bestimmt in einer nicht reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelektrophorese, und wobei die zwei Polypeptidketten des genannten Moleküls ein Molekulargewicht von etwa 27 kDa und etwa 29 kDa haben, gemessen in einer reduzierenden SDS-Polyacrylamidgelektrophorese.

25 2. Ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen enthaltend eine Aminosäuresequenz, die mindestens 40% Homologie mit der 199 Aminosäure umfassenden Sequenz in Fig. 15 (SEQ ID NO:2) aufweist, oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

30 3. Ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen gemäß Anspruch 2 und umfassend die Aminosäuresequenz gemäß Fig. 15 (SEQ ID NO:2), oder ein biologisch aktives Fragment oder ein Analogon davon.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1124-09-99

- 2 -

4. Eine DNA-Sequenz, die ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 oder ein Fragment hiervon kodiert.
5. Eine DNA-Sequenz kodierend ein ko-stimulierendes Molekül mit der biologischen Aktivität der Ko-Stimulation von T-Zellen, wobei die Sequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) der DNA-Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 (Fig. 16) und ihren komplementären Strang
  - b) DNA-Sequenz, hybridisierend mit den Sequenzen in (a) und
  - c) DNA-Sequenzen, die aufgrund der Degeneration des genetischen Codes mit den Sequenzen in (a) und (b) hybridisieren.
6. Ein Plasmid oder ein viraler DNA-Vektor, enthaltend eine DNA-Sequenz nach Anspruch 4 oder 5.
7. Eine prokaryotische oder eukaryotische Wirtszelle, stabil transformiert oder transfiziert mit einem Plasmid oder DNA-Vektor nach Anspruch 6.
8. Verfahren zur Herstellung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3, umfassend das Kultivieren der Wirtszelle nach Anspruch 7 zur Expression des genannten Moleküls in der Wirtszelle.
9. Ein Antikörper, der ein ko-stimulierendes Molekül gemäß einem der Ansprüche 1-3 bindet.
10. Ein Antikörper gemäß Anspruch 9, der ein monoklonaler Antikörper ist.
11. Ein monoklonaler Antikörper, der ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennt, dadurch gekennzeichnet, daß B-Zellen von Mäusen, die mit PMA und der  $Ca^{2+}$ -Ionophore Ionomycin

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

M 24.08.98

- 3 -

aktivierten humanen T-Lymphozyten immunisiert werden, mit einer Myelomzelllinie zu einem Antikörper sezernierenden Hybridom fusioniert werden und die monoklonalen Antikörper in der Durchflußzytometrie auf 2-Signal-Molekül-aktivierte gegen ruhende T-Zellen gereinigt werden.

5

12. Eine Hybridomzelle, die den monoklonalen Antikörper nach Anspruch 10 oder 11 erzeugt.

10

13. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, als Arzneimittel.

15

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei die Substanzen einen monoklonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.

20

15. Verwendung von Substanzen, die die biologische Aktivität eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 hemmen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten, zur Verhinderung der Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen und zur Behandlung einer Dysregulation des Immunsystems.

25

16. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 als Arzneimittel.

30

17. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11.24.09.09

- 4 -

18. Verwendung von Zellen, enthaltend ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3, als Arzneimittel.
19. Verwendung von Zellen nach Anspruch 18 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen, Aids, Asthmaerkrankungen oder chronischen viralen Erkrankungen wie HCV- oder HBV-Infektionen.
20. Verwendung von Substanzen, die ein ko-stimulierendes Molekül nach einem der Ansprüche 1-3 spezifisch erkennen, zur Diagnose von Erkrankungen, an denen das Immunsystem beteiligt ist.
21. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen Nukleinsäure-(RNA, DNA)- Moleküle umfassen.
22. Verwendung nach Anspruch 21, wobei zur Diagnose eine Hybridisierungs- oder Nukleinsäureamplifikationstechnik (z.B. PCR) verwendet wird.
23. Verwendung nach Anspruch 20, wobei die Substanzen einen monokonalen Antikörper, natürliche oder synthetische Liganden, Agonisten oder Antagonisten umfassen.
24. Verwendung nach Anspruch 20 oder 21, wobei zur Diagnose ein ELISA-Nachweis, Durchflußzytometrie, Western Blot, Radioimmun-assay, Nephelometrie oder eine histochemische Anfärbung verwendet wird.
25. Verwendung von Substanzen, die den Signaltransduktionsweg eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 in die T-Zelle positiv oder negativ beeinflussen (modulieren) als Arzneimittel.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

M 24.09.99

- 5 -

26. Verwendung von Substanzen, die die Heraufregulation eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 an die T-Zelloberfläche verhindern als Arzneimittel.
- 5 27. Verwendung eines ko-stimulierenden Moleküls nach einem der Ansprüche 1-3 zur Herstellung von Antikörpern.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

**PCT**

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>169-2 PCT</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b>	siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/DE 98/ 02896</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/09/1998</b>	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>23/09/1997</b>
Anmelder <b>BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND LETZTVERTRETEREN . . et al.</b>		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.



Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

**1. Grundlage des Berichts**

a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2.  **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3.  **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

**4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**5. Hinsichtlich der Zusammenfassung**

wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

**6. Folgende Abbildung der Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 14

wie vom Anmelder vorgeschlagen

keine der Abb.

weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 98/02896

## Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich  

Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2.  Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3.  Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1.  Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2.  Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3.  Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4.  Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

### Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.  
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Obwohl die Ansprüche 13-19, 25 und 26 sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>
	<p>Obwohl die Ansprüche 20-24 sich auf ein Diagnostizierverfahren, das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird, beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.</p>

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**